

**Vinicius Ponzio da Silva**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENOTÍPICA DA  
CRIPTOCOCOSE EM PACIENTES SUBMETIDOS A  
TRANSPLANTE RENAL**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, para obtenção  
do Título acadêmico de Doutor em  
Ciências.

São Paulo  
2019

**Vinicius Ponzio da Silva**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENOTÍPICA DA  
CRIPTOCOCOSE EM PACIENTES SUBMETIDOS A  
TRANSPLANTE RENAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de acadêmico de Doutorado em Ciências.

**Orientador:**

Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

**Supervisor no exterior:**

Prof. Dr. John R. Perfect

São Paulo

2019

Ponzio, Vinicius da Silva

**Caracterização Clínica e Genotípica da Criptococose em Pacientes Submetidos a Transplante Renal.** Vinicius Ponzio da Silva. -- São Paulo, 2019.  
xxi, 103f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia

Título em inglês: Clinical and Genotyping Characterization of Cryptococcosis in Renal Transplant Recipients

1. Criptococose. 2. Transplante de rim. 3. *Cryptococcus*. 4. Técnicas de genotipagem.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**  
**DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA**

**Chefe do Departamento:** Prof<sup>a</sup>. Ana Luisa Godoy Fernandes

**Chefe da Disciplina de Infectologia:** Prof. Marcelo Nascimento  
Burattini

**Coordenador do Curso de Pós-Graduação:** Prof. Dr. Ricardo Sobhie  
Diaz

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Especial de Micologia, da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina e no the Perfect Laboratory, Duke University School of Medicine, Durham, North Carolina, United State of America. Foi aprovado pelo Comitê de Ética (318847, 2013), da Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES PROEX e PDSE - 7573/13-8) e Public Health Service Grants (AI73896, AI93257, AI04533 - JRP).



**Vinicius Ponzio da Silva**

## **CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENOTÍPICA DA CRIPTOCOCOSE EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL**

### **Presidente da banca**

**Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo**

Professor Titular da Disciplina de Infectologia  
Escola Paulista de Medicina - UNIFESP

---

### **Banca examinadora**

**Prof. Dr. José Ernesto Vidal Bermúdez**

Médico Assistente do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias  
Faculdade de Medicina – USP

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ligia Camera Pierrotti**

Médica Assistente do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias  
Faculdade de Medicina - USP

---

**Prof. Dr. Luis Fernando Aranha Camargo**

Professor Titular de Disciplina de Infectologia  
Escola Paulista de Medicina - UNIFESP

---

**Prof. Dr. João Nóbrega de Almeida Junior**

Médico Assistente do Serviço de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central  
Faculdade de Medicina – USP

---

### **Suplentes**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Analy Salles de Azevedo Melo**

Professora Adjunta da Disciplina de Infectologia  
Escola Paulista de Medicina – UNIFESP

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia de Souza Carvalho Melhem**

Docente pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de  
Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo  
Instituto Adolfo Lutz

---

## **Dedicatória**

Aos meus queridos pais,

### **Levy Ferreira da Silva e Marlene Ponzio da Silva**

Por me ensinarem tudo que sabem e me apoiarem desde o início, sempre acreditando em mim e querendo que eu me tornasse uma pessoa cada vez melhor. Sempre amarei vocês.

A minha nonna,

### **Maria Oriolo Ponzio**

Pelo amor, a transmissão de experiência, os ensinamentos de vida e as ótimas memórias que sempre guardarei para mim. Ficará sempre junto de meu coração.

Ao meu irmão,

### **Luciano Ponzio da Silva**

Pela sua gratidão, disponibilidade e amor que sinto, mesmo estando distante.

À minha madrinha de coração,

### **Rosina D'Angina**

Por tanto carinho e força positiva no percorrer desta vida. Eu a considero minha segunda mãe.

**Muito obrigado por TUDO!!!**

## **Agradecimentos**

Aos meus **orientadores** da UNIFESP/EPM e Duke,

Por ter, heroicamente, me guiado nessa trilha tortuosa, mas com uma vista para o mar ao final.

Aos **pacientes**,

Por proporcionarem as pedras desse caminho.

Aos meus **professores** da UNIFESP/EPM e PUCC-Campinas,

Por grandes ensinamentos e por terem me mostrado a trilha.

Aos meus **colegas de bancada** da UNIFESP/EPM e Duke,

Por caminharem em conjunto comigo nessa trilha e compartilharem dos ensinamentos durante o caminho.

Aos **profissionais**,

Por me ajudarem na análise minuciosa dos trechos perigosos dessa trilha.

Aos **colegas de trabalho, familiares, amigos, secretária e amores**,

Por caminharem comigo em alguns trechos ou mesmo estarem em pensamento, dividindo as angústias e os prazeres da caminhada.

Aos **terapeutas**,

Por me manterem de pé, seguindo em frente e estarem preparados para me acolher nos momentos mais tortuosos dessa trilha.

**MUITO OBRIGADO!**

*"Que Deus me dê serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar, coragem para mudar as que posso e sabedoria para distinguir entre elas."*

*Reinhold Niebuhr*

## Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xii
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xx
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.A importância médica da criptococose .....</b>	<b>2</b>
1.1.1.Agente etiológico .....	2
1.1.2.Epidemiologia e patogenia da criptococose .....	8
1.1.3.Manifestações clínicas.....	10
1.1.4.Diagnóstico .....	12
1.1.5.Tratamento .....	14
<b>1.2.Criptococose e transplante renal .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.Fatores de virulência e fatores prognósticos.....</b>	<b>22</b>
1.3.1.O papel do agente no desfecho clínico.....	22
1.3.2.O papel do hospedeiro no desfecho clínico .....	26
<b>1.4.Avaliação de resistência e impacto clínico .....</b>	<b>27</b>
<b>2. OBJETIVOS E DELINEAMENTO DO ESTUDO .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Etapa 1: Incidência e impacto clínico da criptococose em transplante renal .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2 Etapa 2: Diversidade genotípica e sua relevância clínica .....</b>	<b>31</b>
<b>3. ARTIGOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>34</b>
3.1.Artigo Científico 1 .....	35
3.2.Artigo Científico 2 .....	45
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1 Etapa 1: Incidência e impacto clínico da criptococose em transplante renal .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2 Etapa 2: Diversidade genotípica e sua relevância clínica .....</b>	<b>60</b>
<b>5. APÊNDICE .....</b>	<b>62</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>

## Lista de figuras

### Revisão Bibliográfica:

- Figura 1 -** Esquema da atual taxonomia e correlação entre as espécies do complexo *C. neoformans*/*C. gattii* com sorotipos e genótipos..... **4**

### Delineamento do Estudo:

- Figura 2 -** Fluxograma do delineamento do estudo..... **30**
- Figura 3 -** Esquema dos métodos convencionais de identificação dos complexos *C. neoformans*/*C. gattii* utilizados na etapa 2 do estudo..... **32**
- Figura 4 -** Esquema dos métodos para identificação genotípica por “Next Generation Multilocus Sequence Typing” (NGMLST) dos complexos *C. neoformans*/*C. gattii* utilizados na etapa 2 do estudo..... **33**

### Artigo 1:

- Figure 1 -** Temporal trend of serum creatinine levels in patients treated with amphotericin B according to the presence (n = 8) or absence of additional nephrotoxic conditions (n = 31)..... **39**
- Figure 2 -** Kaplan-Meier graft survival analysis in patients treated with amphotericin B and who had allograft dysfunction according to the presence (n = 8) or absence of additional nephrotoxic conditions..... **40**

### Artigo 2:

- Figure 1 -** Molecular type distribution of 82 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complexes (A) cultured from 60 renal transplants recipients (B)..... **49**
- Figure 2 -** Phylogenetic relationships as inferred from a maximum likelihood analysis of *CAP59*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*, *TEF1* and *IGS1* sequences from 82 strains of *C. neoformans* and *C. gattii* from transplant patients and 63 reference strains, covering the main molecular types described. The numbers close to the branches represent indices of support (maximum likelihood / neighbor-joining) based on 1000 bootstrap replications. The branches with bootstrap support higher than 70% are indicated in bold..... **50**

- Figure 3 -** Median-joining haplotype network of 144 isolates of *C. neoformans/C. gattii* species complexes (81 isolates originated in this study in addition to 63 reference strains recovered from literature), covering all the concatenated loci CAP59, LAC1, PLB1, SOD1, URA5, TEF1 and IGS1 sequences. The isolates are coded, and their frequencies are represented by (A) fluconazole minimum inhibitory concentration (MIC)  $\geq$  than 16 mg l<sup>-1</sup> from transplant recipients isolates or (B) 90-days mortality of transplant recipients. The size of the circumference is proportional to the haplotype frequency. The black dots (median vectors) represent unsampled or extinct haplotypes in the population..... **51**
- Figure 4 -** Kaplan-Meier analysis of 12 weeks survival of 60 renal transplant recipient infected by *C. neoformans/C. gattii* species complexes according to fluconazole minimum inhibitory concentration (MIC)  $\geq$  16 mg l<sup>-1</sup> (n = 8) or MIC < 16 mg l<sup>-1</sup> (n = 52)..... **54**

## Lista de tabelas

### Revisão Bibliográfica:

<b>Tabela 1 -</b>	Resumo das características dos diferentes genótipos dos complexos de espécies <i>C. neoformans/C.gattii</i> .....	<b>7</b>
-------------------	---	----------

### Artigo 1:

<b>Table 1 -</b>	Demographic and clinical characteristics of the 47 study patients.....	<b>38</b>
<b>Table 2 -</b>	Analysis of the variables associated with kidney graft loss within 30 days after cryptococcosis.....	<b>40</b>
<b>Table 3 -</b>	Analysis of variables associated with mortality 30 days after cryptococcosis in study patients.....	<b>41</b>

### Artigo 2:

<b>Table 1 -</b>	Demographic and clinical characteristics of 60 renal transplant recipients infected by <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> species complexes.....	<b>48</b>
<b>Table 2 -</b>	Comparisons of infections due to <i>C. neoformans</i> and <i>C. gattii</i> complex in 60 renal transplant recipients.....	<b>52</b>
<b>Table 3 -</b>	Fluconazole minimum inhibitory concentration (MIC) distribution for 82 isolates of <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> species complexes tested.....	<b>52</b>
<b>Table 4 -</b>	Variables associated with 30 day-mortality after cryptococcosis in 60 renal transplant recipients .....	<b>53</b>



## **Lista de abreviaturas, siglas e símbolos**

<b>5-FC</b>	5-Fluorocitosina
<b>AFLP</b>	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificado
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>AMB</b>	Anfotericina B
<b>CGB</b>	Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol
<b>CLSI</b>	The Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMI</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CO</b>	Dióxido de Carbono
<b>dL</b>	Decilitro
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EPM</b>	Escola Paulista de Medicina
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>GXM</b>	Glucuronoxilomanana
<b>HAART</b>	Terapia Antirretroviral de Alta Atividade
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>l</b>	Litro
<b>LCR</b>	Líquido Cefalorraquidiano
<b>MALDI-TOF MS</b>	Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MLST</b>	Tipagem Molecular Multi-locus
<b>mm</b>	Milímetro

<b>µm</b>	Micrograma
<b>NGMLST</b>	Next Generation Multilocus Sequence Typing
<b>P</b>	Probabilidade
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia de Polimerase
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>SIRI</b>	Síndrome Inflamatória da Resposta Imune
<b>SMRT</b>	Molécula Única em Tempo Real
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>spp.</b>	Espécies
<b>TOS</b>	Transplante de Órgãos Sólidos
<b>UNIFESP</b>	Universidade Federal de São Paulo
<b>UNOS</b>	United Network for Organ Sharing
<b>var.</b>	Variedade
<b>YEPD</b>	Yeast Extract Peptone Dextrose
<b>%</b>	porcentagem
<b>° C</b>	graus Celsius
<b>α</b>	alfa

#### Artigo 1:

<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome
<b>AMBd</b>	Amphotericin B Deoxycholate
<b>cm</b>	Centimeter
<b>CNS</b>	Central Nervous System
<b>CSF</b>	Cerebrospinal Fluid
<b>d</b>	Days

<b>dL</b>	Deciliter
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Water
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus
<b>IDSA</b>	Infectious Diseases Society of America
<b>IRIS</b>	Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome
<b>Kg</b>	Kilogram
<b>l</b>	Liter
<b>mg</b>	Milligram
<b>mm</b>	Millimeter
<b>Nº</b>	Number
<b><i>P</i></b>	Probability
<b>spp.</b>	Species
<b>SD</b>	Standard Deviation
<b>SOT</b>	Solid Organ Transplant
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>wk</b>	Week
<b>%</b>	porcentagem
<b>≥</b>	maior ou igual a
<b>&gt;</b>	maior
<b>&lt;</b>	menor
<b>±</b>	mais ou menos

## Artigo 2:

<b>5FC</b>	5-Flucytosine
<b>AMBd</b>	Amphotericin B Deoxycholate
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection

<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CI</b>	Confidence Interval
<b>CNPQ</b>	National Council of Technological and Scientific Development
<b>CNS</b>	Central Nervous System
<b>CSF</b>	Cerebrospinal Fluid
<b>dL</b>	Deciliter
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>H</b>	Haplotype
<b>Hd</b>	Haplotype Diversity
<b>l</b>	Liter
<b>mg</b>	Milligram
<b>MIC</b>	Minimum Inhibitory Concentrations
<b>MLST</b>	Multilocus Sequence Typing
<b>mm</b>	Millimeter
<b>Nº</b>	Number
<b>NGMST</b>	Next Generation Multilocus Sequence Typing
<b>OD</b>	Odds Ratio
<b><i>P</i></b>	Probability
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>SD</b>	Standard Deviation
<b>SOT</b>	Solid Organ Transplant
<b>spp.</b>	Species
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>ST</b>	Sequence Type

<b>UNIFESP</b>	Universidade Federal de São Paulo
<b>YPD</b>	Yeast Peptone Dextrose
<b>%</b>	porcentagem
<b>≥</b>	maior ou igual a
<b>&gt;</b>	maior
<b>&lt;</b>	menor
<b>±</b>	mais ou menos
<b>π</b>	nucleotide diversity

## Resumo

Criptococose é a segunda doença fúngica invasiva mais prevalente em pacientes submetidos a transplante de órgãos. O Brasil apresenta uma substancial diversidade genotípica dos complexos de espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. O desfecho clínico da criptococose, a evolução do enxerto após o tratamento e o impacto clínico dos diferentes genótipos dessa levedura nos pacientes submetidos a transplante renal foram pobremente estudados, especialmente nos países emergentes. **Artigo 1:** O objetivo desse estudo foi avaliar a disfunção do enxerto e seu impacto nos pacientes submetidos a transplante renal com criptococose que receberam terapia antifúngica. Foram coletados os dados de 47 pacientes transplantados de uma única instituição, durante o período de 13 anos. A disfunção do enxerto e mortalidade foram analisados, assim como foram estimados os fatores de risco para mortalidade e perda do enxerto. Trinta e oito (97,4%) pacientes tratados com anfotericina B desoxicolato evoluíram com disfunção do enxerto e oito (18,2%) apresentaram perda do enxerto renal. A perda do enxerto com 30 dias após a criptococose foi significativamente associado à doença disseminada, creatinina basal alta e disfunção do enxerto em pacientes tratados com anfotericina B desoxicolato e que apresentavam uma condição adicional de injúria renal. A taxa de mortalidade em 30 dias foi de 19,2% e significativamente associada à doença disseminada, comprometimento pulmonar, sonolência na admissão, pressão de abertura liquórica alta, tinta da China positiva no líquido, creatinina admissional maior que 2,0 mg/dL, disfunção do enxerto em pacientes tratados com anfotericina B desoxicolato associada a uma condição adicional de injúria renal e perda do enxerto em 30 dias. A taxa de perda do enxerto foi alta, principalmente nos

pacientes com condições adicionais de injúria renal. Portanto, nossos dados colaboram na recomendação de evitar anfotericina B desoxicolato nessa população, particularmente nos pacientes com disfunção renal na admissão ou expostos a outra condição de injúria renal. **Artigo 2:** O objetivo desse estudo foi caracterizar os genótipos dos complexos de espécies *C. neoformans*/*C. gattii* e analisar os fatores associados ao desfecho clínico da criptococose em pacientes submetidos a transplante renal no Brasil. Foi analisada a diversidade genética e o padrão de susceptibilidade para o fluconazol de 82 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* de 60 transplantados renais. As características clínicas dos pacientes e os fatores prognósticos foram determinados. Setenta e dois isolados (87,8%) foram identificados como *C. neoformans* e 10 (12,2%) como *C. gattii*. O VNI foi o genótipo mais frequente (40 casos; 66,7%), seguido do VNII (9 casos; 15%), VGII (6 casos; 10%), VNB (4 casos; 6,7%) e VNI/II (1 caso; 1,7%). Os isolados apresentaram uma alta diversidade genética na rede haplotípica e seis novos “sequence types” foram encontrados. Pacientes infectados por isolados não identificados como tipo molecular VNI apresentaram significativamente mais comprometimento cutâneo que os infectados por VNI ( $P = 0,012$ ). Isolados do genótipo VGII exibiram alta concentração inibitória mínima para fluconazol quando comparado com os isolados de *C. neoformans* ( $P = 0,008$ ). A taxa de mortalidade em 30 dias foi de 28,3% e foi significativamente associada à fungemia e ausência de cefaleia. Além disso, pacientes infectados pelo genótipo VGII apresentaram uma alta taxa de mortalidade em 90 dias (66,7%). Uma grande variedade de genótipos infecta pacientes transplantados no Brasil, ressaltando os genótipos VGII e VNB. A criptococose em pacientes submetidos a transplante renal foi associada à alta mortalidade no Brasil. Nós reportamos o impacto das particularidades clínicas, dos diferentes genótipos e

do perfil de susceptibilidade para o fluconazol dos isolados sobre o desfecho de pacientes com alto risco de criptococose.



## Abstract

Cryptococcosis is the second most common invasive fungal infections in renal transplant recipients and Brazil has substantial genotypic diversity in *C. neoformans*/*C. gattii* species complexes. Clinical outcome of cryptococcosis, graft outcome after treatment and the impact of the molecular type of the yeasts in renal transplant recipients have been scarcely studied, especially in less resource-available countries. **Article 1:** The purpose of this study was to assess renal allograft dysfunction and its impact on renal transplant recipients with cryptococcosis receiving antifungal therapy. Data from 47 renal transplant recipients were retrospectively collected at a single institution during a period of 13 years. Graft dysfunction, graft loss and mortality rates were evaluated. Predictors of mortality and graft loss were estimated. A total of 38 (97.4%) patients treated with amphotericin B deoxycholate showed graft dysfunction and eight (18.2%) had kidney graft loss. Graft loss within 30 days after cryptococcosis onset was significantly associated with disseminated infection, greater baseline creatinine levels and graft dysfunction concomitant to amphotericin B deoxycholate therapy and an additional renal injury condition. The 30-day mortality rate was 19.2% and it was significantly associated with disseminated and pulmonary infections, somnolence at admission, high cerebrospinal fluid opening pressure, positive cerebrospinal fluid India ink, creatinine levels greater than 2.0 mg/dL at admission, graft dysfunction in patients treated with amphotericin B deoxycholate and an additional renal injury condition and graft loss within 30 days. The rate of graft loss rate was high, most frequently in patients with concomitant renal injury conditions. Therefore, the clinical focus should be on the use of less nephrotoxic lipid formulations of amphotericin B in this specific population. **Article 2:**

The purpose of this study was to characterize the molecular types of *C. neoformans*/*C. gattii* species complexes and assess the factors associated with clinical outcome of cryptococcosis in renal transplant recipients in Brazil. We examined the genotypic diversity and fluconazole susceptibility pattern of 82 *C. neoformans* and *C. gattii* isolates from 60 renal transplant recipients. Clinical characteristics of the patients and prognostic factors were analyzed. A total of 72 (87.8%) isolates were *C. neoformans* and 10 (12.2%) were *C. gattii*. VNI was the most common molecular type (40 cases; 66.7%), followed by VNII (9 cases; 15%), VGII (6 cases; 10%), VNB (4 cases; 6.7%) and VNI/II (1 case; 1.7%). The isolates showed a high genetic diversity in the haplotype network and six new sequence types were described, most of them for VNB. There was a bias towards skin involvement in the non-VNI population ( $P = 0.012$ ). VGII isolates exhibited higher fluconazole minimum inhibitory concentrations compared to *C. neoformans* isolates ( $P = 0.008$ ). The 30-day mortality rate was 38.3% and it was significantly associated with fungemia and absence of headache. Furthermore, patients infected with VGII had a particularly high mortality rate at 90 days (66.7%). A variety of molecular types produces disease in renal transplant recipients in Brazil and highlighted by VGII and VNB. Cryptococcosis in renal transplant recipients is associated with high mortality in less-available resource health care settings. We report the clinical appearance and impact of the molecular type, fluconazole susceptibility of the isolates, and certain clinical characteristics on the patient outcome in this high risk population.

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 1.1. A importância médica da criptococose

### 1.1.1. Agente etiológico

A criptococose é uma micose sistêmica causada pelo fungo basideomiceto do gênero *Cryptococcus*, que corresponde a um fungo leveduriforme, usualmente esférico, com 2 a 20 µm de diâmetro, envolvido por grossa cápsula polissacarídea.<sup>(1)</sup>

<sup>2)</sup> Apesar de existirem 70 espécies no gênero *Cryptococcus*, as espécies dos complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são responsáveis pela maioria das infecções em humanos.<sup>(2, 3)</sup>

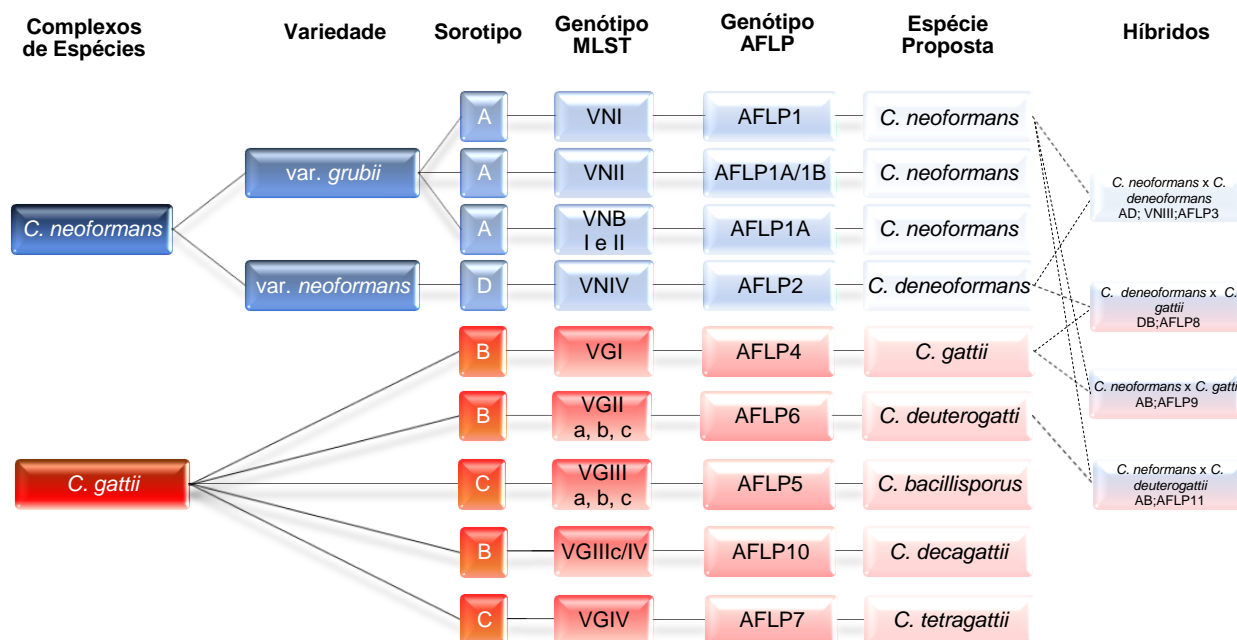
O fungo foi isolado inicialmente em 1894, entretanto seu ciclo de vida completo só foi definido em 1978, quando Kwon-Chung identificou as formas perfeitas ou sexuadas do *C. neoformans* e *C. gattii*, descritas respectivamente como *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillispora*.<sup>(1, 3)</sup> O estado assexuado é representado pela forma leveduriforme haploide que se reproduz por brotamento e pode ser observado em dois “mating types”: α ou a no ambiente e espécimes clínicos. Em torno de 95% dos isolados clínicos e ambientais são “mating type” α, que pode ser explicado pela capacidade de frutificação monocariótica.<sup>(2, 4, 5)</sup> O estado perfeito existe como hifas e grampos de conexão fusionados e se reproduzem sexualmente por meiose de dois “mating type” diferentes ou iguais, formando basidiósporos.<sup>(2, 6)</sup>

Todas as espécies do gênero *Cryptococcus* são não-fermentadoras de açúcares, produzem urease e assimilam o inositol. A maioria dos isolados cresce bem após 48 a 72h entre 30°C a 37°C, sendo a cultura de coloração branca a creme e de aspecto liso ou mucoide.<sup>(6, 7)</sup> Juntamente com essas características bioquímicas, a ausência de formação de hifas ou pseudo-hifas, torna possível a identificação desse gênero entre as demais leveduras. A diferenciação das espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* das outras é determinada basicamente pelo crescimento a 37°C, produção de colônia marrom no ágar niger e a presença de cápsula.<sup>(7)</sup> A base bioquímica para a diferenciação dessas espécies foi elucidada por Min e Kwon-Chung (1986)<sup>(8)</sup>, pelo uso do meio seletivo canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), que diferencia essas duas espécies com uma acurácia de 100%.<sup>(9, 10)</sup>

Atualmente, baseada em numerosas diferenças ecológicas, epidemiológicas, patológicas, bioquímicas e genéticas, são reconhecidas pelo menos dois complexos de espécies responsáveis pela criptococose: *C. neoformans* e *C. gattii*.<sup>(11, 12)</sup> Essas espécies são consideradas irmãs, já que a identidade genômica é de 85 a 90%.<sup>(13)</sup> Entretanto, alguns autores defendem a separação em sete diferentes espécies.<sup>(14)</sup> Os autores que consideram a nomenclatura de dois complexos de espécie se baseiam no conceito que, para reconhecer duas espécies diferentes, essas devem ser facilmente e consistentemente diferenciadas em laboratórios de rotina por características fenotípicas, sem necessidade de equipamento ou técnica especial.<sup>(11, 12)</sup> Na rotina do laboratório clínico, a diferenciação entre as espécies dos complexos não é realizada na maioria das vezes e quando executada, geralmente, utiliza provas fenotípicas com o CGB descrito anteriormente. A sorotipagem não está mais disponível no mercado e a utilização de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) ainda não está bem estabelecida para esse fungo, mas com resultados promissores.<sup>(15, 16)</sup> Portanto, atualmente, a diferenciação do complexo é feita por metodologia molecular, por meio da análise de sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) de um alvo específico. Estas técnicas de tipagem molecular requerem a amplificação dos fragmentos de DNA por reação em cadeia de polimerase (PCR) e posterior sequenciamento dos produtos obtidos.<sup>(17)</sup> Em 2009, foi publicado um consenso para padronizar a genotipagem dos complexos *C. neoformans/C.gattii*, sendo escolhida a técnica de tipagem sequencial multi-locus (MLST), que é a mais utilizada atualmente.<sup>(18)</sup> Essa técnica é altamente discriminativa para a grande maioria dos fungos patogênicos ao homem, acurada, estável e tem um banco de dados público disponível. Foi definido pela utilização de seis diferentes “loci” genéticos conservados (*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1* e *URA5*) e a região nuclear ribossomal *IGS1*. Para definir a correlação entre isolados e identificar genótipos, essa técnica é uma substituta confiável do sequenciamento de genomas completos.<sup>(18-20)</sup>

Resumidamente, com base nessas técnicas moleculares, pode-se separar essas espécies em três variedades, cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) e nove genótipos ou tipos moleculares. O complexo *C. neoformans* pode ser classificado como *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A e genótipos VNI, VNII e VNB), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos D e genótipo VNIV) e a forma híbrida diploide sorotipo AD (genótipo VNIII). Já para o complexo *C. gattii*, são reconhecidos o

sorotipo B e C e os genótipos VGI, VGII, VGIII, VGIV.<sup>(12, 19)</sup> Alguns autores sugerem que o complexo *C. gattii* pode ser dividido em cinco espécies crípticas: *C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deutorogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*.<sup>(14, 21)</sup> Entre esses genótipos, várias linhagens já foram identificadas, como VNBI, VNBII, VGIIa, VGIIb, VGIIc, VGIIIa, VGIIIb and VGIIIC.<sup>(12, 19)</sup> A **Figura 1** resume a atual taxonomia das espécies e as correlações entre os sorotipos e genótipos dos complexos. No decorrer da dissertação será utilizado o termo complexos de espécies *C. neoformans/C. gattii*.



Legenda: AFLP, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificado; MLST, tipagem sequencial multi-locus.

Fonte: adaptado das referências Hagen et al. (2016), Kwon-Chung et al. (2017) e Cuomo et al. (2018).<sup>(12, 14, 19)</sup>

**Figura 1 – Esquema da atual taxonomia e correlação entre as espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* com sorotipos e genótipos.**

O complexo de espécie *C. neoformans* é ubíquo e isolados clínicos já foram relatados em todo o mundo.<sup>(22)</sup> Esse fungo é cosmopolita, tem como “habitat” o solo, as fezes de pássaros, principalmente pombos e psitacídeos e também pode ser encontrado em madeiras em decomposição, ocos de árvores, amebas, tatuzinhos-de-jardim e poeira doméstica.<sup>(2, 23-27)</sup> Já o complexo *C. gattii* era primariamente

encontrado em regiões tropicais e subtropicais associado a espécies de eucaliptos.<sup>(25, 26)</sup> No entanto, evidências emergentes do surto de criptococose na ilha de Vancouver demonstram que esse fungo também pode ser encontrado em árvores de clima temperado (pinheiros, cedros e carvalhos) e até na água e no ar.<sup>(28)</sup> Recentemente, isolados do complexo *C. gattii*, assim como do *C. neoformans* foram coletados em árvores tipicamente mediterrâneas, como oliveiras e alfarrobeiras.<sup>(29)</sup> Essas diferenças de “habitat” podem estar relacionadas à capacidade do complexo *C. neoformans* em crescer e utilizar fontes de nitrogênio em meios ricos em amônia, como as fezes de alguns tipos de pássaros quando comparado com o complexo *C. gattii*.<sup>(30)</sup> Outros fatores que propiciam o isolamento do complexo *C. neoformans* em fezes de pássaros de cativeiro são a alta densidade de animais e cuidados de higiene precários.<sup>(27)</sup> Quanto ao motivo de isolamento frequente do complexo em amostras de árvores, foi, recentemente, decifrado por Spriner et. al. (2017), na qual demonstram que debris de algumas plantas com folhas com cutícula vegetal promovem o crescimento, o cruzamento e a produção de propágulos infectantes dos complexos.<sup>(31)</sup> Inclusive, as espécies de *C. gattii* são geneticamente codificadas para melhor utilizar os D-aminoácidos, que são abundantes na decomposição das plantas, colaborando com a maior frequência de isolamento dessas espécies em plantas.<sup>(32)</sup> Mais recentemente, Cogliati, et al. (2017) sugeriram os potenciais fatores que podem contribuir na definição do nicho dos complexos no território europeu. Baseado em condições climáticas e dados de isolamento ambiental do fungo, os autores sugerem que a distribuição das espécies é limitada por baixas temperaturas na estação mais fria e alta precipitação nas estações mais secas, observando que o *C. gattii*, por ser menos tolerante ao frio e precipitações, é mais isolado na região costeira e relacionado a alguns tipos de plantio quando comparado com o *C. neoformans*.<sup>(33)</sup>

Dados nacionais sobre o habitat do fungo demonstram que o *C. gattii* é isolado, além das espécies de eucaliptos, também em outras árvores como a figueira, o jabolão, a cássia, a acácia, o cacaueiro, o oiti e a sibipiruna.<sup>(25, 26, 34)</sup> As espécies de ambos os complexos são igualmente encontradas em ambientes cosmopolitas, como poeira doméstica, parques públicos, escolas, igrejas e bibliotecas, demonstrando a dispersão dentro do nosso país.<sup>(35-38)</sup> Por exemplo, a ocorrência de *C. neoformans* na cidade de São Paulo foi estudada por Montenegro et al. (2000), encontrando alta positividade (26,3%) de *C. neoformans* var *grubii* nas

fezes de pombos em locais no centro da cidade com alta densidade populacional. Amostras do complexo *C. neoformans/C. gattii* foram também isoladas de fragmentos de eucaliptos de três grandes parques de São Paulo, em diferentes meses, sugerindo dispersão sazonal do fungo.<sup>(36)</sup> Vale ressaltar que apesar dos casos de criptococose nos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) documentados nas regiões Norte e Nordeste do Brasil ocorrerem mais frequentemente pelo *C. neoformans* var *grubii*, observou-se nessas regiões que o *C. gattii* sorotipo B comprometeu pacientes com AIDS 10 vezes mais que o anterior, quando comparado com a região Sudeste. Do mesmo modo, isolados ambientais do oco das árvores no Nordeste foram predominantemente de *C. gattii* sorotipo B, contrastando com o Sudeste onde *C. neoformans* var *grubii* predomina. Esses achados sugerem que o *C. gattii* sorotipo B comporta-se como um patógeno endêmico no Nordeste, sendo menos documentado na região Sudeste.<sup>(34)</sup>

Quanto à epidemiologia molecular, a distribuição mundial dos genótipos dos complexos *C. neoformans/C. gattii* é baseado em dados integrados de vários estudos, demonstrando que o complexo *C. neoformans* é oito vezes mais frequentemente isolado que o *C. gattii*.<sup>(22)</sup> No Brasil, todos os genótipos, exceto o VGIV, já foram reportados<sup>(39)</sup> e alguns estudos recentes, baseados em MLST e sequenciamento completo do genoma, sugerem que o Brasil deve ser o centro global da diversidade dos complexos e local de origem de alguns genótipos.<sup>(40-44)</sup> Com relação ao complexo *C. neoformans*, a maioria dos isolados clínicos (67%) e ambientais (41%) são VNI e esse genótipo é encontrado mundialmente.<sup>(45)</sup> No Brasil, dados combinados de isolados clínicos e ambientais constataam que 58,7 a 98% dos isolados são VNI.<sup>(22, 39, 46-53)</sup> O genótipo VNII é menos frequente e apresenta distribuição territorial semelhante ao VNI, enquanto que os genótipos VNIII e VNIV são mais comumente encontrados na Europa e poucos casos são reportados em outras regiões geográficas.<sup>(22, 39, 45)</sup> Os isolados VNB de *C. neoformans*, que eram considerados primariamente restritos à África<sup>(54)</sup>, foram recentemente descritos em outros continentes, sendo seis isolados clínicos e oito isolados ambientais: um isolado na Itália, um em Portugal, um na China, um na Colômbia e 10 no Brasil (**Tabela 1**).<sup>(55-60)</sup>

No contexto do complexo *C. gattii*, os genótipos mais frequentes isolados são VGI e VGII. Infecções pelo VGI são reportadas globalmente com uma ampla distribuição na Austrália, Ásia e Europa.<sup>(22)</sup> O genótipo VGII é responsável pelo surto



de ilha de Vancouver do Canadá e no pacífico Noroeste dos Estados Unidos da América (EUA)<sup>(61, 62)</sup>, mas também é encontrado globalmente.<sup>(22)</sup> No Brasil o VGII é o segundo genótipo mais isolado após o VNI (5,6 a 38,5%)<sup>(22, 39, 46-52)</sup> e é importante mencionar que, recentes descobertas, baseadas em análise de genoma, sugerem que a origem da cepa altamente virulenta do surto canadense é na região Norte ou Nordeste do Brasil.<sup>(41-43)</sup> Por último, o genótipo VGIII é encontrado globalmente e VGIV é restrito à África, Europa, Índia e América do Sul (**Tabela 1**).<sup>(22)</sup>

**Tabela 1 – Resumo das características dos diferentes genótipos dos complexos de espécies *C. neoformans*/*C. gattii*.**

Genótipo (%)	Distribuição	Aspectos Ambientais	Aspectos Clínicos	Virulência	Resistência
<b>VNI</b> <b>VNII</b> <b>VNB</b> <b>(63%)</b>	Global (↑ África) VNB raro fora da África	Fezes pássaros, solo e árvores (VNB)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pássaros</li> <li>• AIDS e TOS</li> <li>• VNB menor sobrevida em AIDS na África</li> </ul>	+ (cápsula) ++++ (37°C)	++
<b>VNIV</b> <b>(5%)</b>	Europa e América	Fezes pássaros, solo e árvores	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imunocompetente, idosos e AIDS</li> <li>• Pele</li> </ul>	++ (37°C)	+
<b>VGI</b> <b>(9%)</b>	Global (↑ Austrália, Ásia e Europa)	Eucaliptos na Austrália e outras árvores	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mamíferos</li> <li>• Imunocompetente, anti GM-CSF, DPOC, uso imunossupressor, TOS, linfopenia idiopática</li> <li>• SNC e criptococoma</li> </ul>	++++ (cápsula) ++ (37°C)	+++
<b>VGII</b> <b>(13%)</b>	Global, endêmico Colúmbia Britânica (VGIIa) ↑ Austrália, América do Norte e Sul	Árvores nativas, ar, solo, água e flor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mamíferos</li> <li>• Surto Colúmbia Britânica e Noroeste Pacífico do EUA (clonal)</li> <li>• Imunocompetente, DPOC, uso de corticóide, AIDS, tabagista, &gt;50 anos, câncer e TOS</li> <li>• Nódulo pulmonar, SNC e criptococoma</li> <li>• VGIIa &gt; mortalidade que VGIIb</li> </ul>	++ (cápsula) ++++ (37°C)	++++
<b>VGIII</b> <b>(4%)</b>	Global ↑ Califórnia, México e América do Sul	Eucaliptos e <i>Corymbia ficifolia</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mamíferos</li> <li>• AIDS</li> </ul>	+++ (cápsula) + (37°C)	++
<b>VGIV</b> <b>(1%)</b>	Raro, África, Índia, Europa e América do Sul	Árvores e Amendoeira	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AIDS</li> </ul>	+ (37°C)	++

Legenda: AIDS, síndrome da imunodeficiência adquirida; DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica; EUA, Estados Unidos da América; GM-CSF, fatores de estimulação de colônia de granulócitos-macrófagos; SNC, sistema nervoso central; TOS, transplante de órgãos sólidos.

### 1.1.2. Epidemiologia e patogenia da criptococose

Apesar da ampla distribuição dos complexos *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* no ambiente em que vivemos, a criptococose é doença de ocorrência esporádica. Aparentemente, há grande desproporção entre o número de pessoas expostas e as que se infectam ou adoecem.<sup>(2, 7)</sup> Entretanto, estima-se que em 2014 ocorreram 223 mil casos de neurocriptococose em pessoas vivendo com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) globalmente e a terceira região com maior incidência é a América Latina com 5.300 casos.<sup>(63)</sup> Além disso, a estimativa de morte desses pacientes é de 600 mil por ano<sup>(64)</sup>, 15% da mortalidade global relacionada à AIDS.<sup>(63)</sup> No Brasil, a incidência estimada de neurocriptococose é de 3,3 casos por 100 mil pacientes HIV positivos por ano.<sup>(65)</sup>

Existem evidências moleculares demonstrando a ligação entre os isolados ambientais e os clínicos<sup>(66, 67)</sup>, portanto é evidente que a criptococose é adquirida após exposição ambiental.<sup>(5, 68)</sup> A infecção criptocócica é adquirida possivelmente pela inalação de leveduras desidratadas ou basidiósporos, que vão se depositar nos alvéolos pulmonares<sup>(2, 69)</sup> e, eventualmente, a infecção pode ser adquirida diretamente por trauma ou transplante de órgãos.<sup>(70-73)</sup> Após a inalação da levedura, é provável que a maioria das pessoas apresente infecção assintomática ou subclínica, que pode ficar latente por anos em fagolisossomas de linfonodos torácicos ou granulomas pulmonares. Quando a imunidade local é suprimida, as leveduras começam a se multiplicar e podem disseminar-se de forma semelhante à fisiopatogenia da tuberculose e histoplasmose.<sup>(2)</sup>

Criptococose pelo complexo *C. neoformans* é uma infecção fúngica oportunista mundialmente conhecida, afetando predominantemente indivíduos com deficiência de imunidade celular, como pacientes com AIDS e pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos (TOS).<sup>(2, 74, 75)</sup> Antes da pandemia da AIDS, essa doença era pouco frequente, sendo descrita em pacientes com neoplasias malignas, em uso de corticosteróides, colagenoses, diabetes mellitus, sarcoidose, transplantes de órgãos sólidos, cirróticos, nefropatas e pacientes com deficiência de imunidade humoral. Porém, também descrita em pacientes aparentemente imunocompetentes.<sup>(2)</sup> Durante as décadas de 80 e 90, com o crescimento da AIDS, a criptococose se tornou uma das principais infecções fúngicas nessa população,

com uma prevalência variando de 2 a 10% nos EUA, Europa ocidental e Austrália<sup>(74, 76-78)</sup> e 5 a 30% na África.<sup>(79, 80)</sup> Essa micose sistêmica se tornou a segunda causa de infecção do sistema nervoso central (SNC) nessa população<sup>(81, 82)</sup> e, conseqüentemente, mais de 80% das infecções criptocócicas ocorriam nesse grupo de pacientes.<sup>(74, 76)</sup> Contudo, após o uso frequente do fluconazol para profilaxia de candidíase esofágica e a introdução da terapia antirretroviral de alta atividade (HAART), observou-se, nos países desenvolvidos, um declínio de casos de criptococose nos pacientes portadores do HIV.<sup>(83-89)</sup> No Brasil essa mudança epidemiológica também pode ser observada no Estado de São Paulo, com a diminuição das notificações de criptococose extrapulmonares como doença definidora de AIDS de 7,5% em 1980 a 1989 para 2% em 2001-2005.<sup>(90)</sup> Entretanto, estudos recentes apontam que a criptococose em AIDS na África Subsaariana ainda se mantém em níveis persistentemente elevados, sendo a principal infecção e causa de morte nessa população.<sup>(91, 92)</sup> Atualmente, como o desenvolvimento da medicina do transplante e das medicações imunossupressoras, o paciente submetido a transplante de órgãos está se tornando um grupo de destaque no estudo da criptococose, correspondendo entre 11 a 43% dos casos dessa doença em pacientes HIV negativos.<sup>(75, 88, 93-96)</sup>

Quanto a ocorrência dos genótipos e população de risco, observa-se que o *C. neoformans* var. *grubii* é o principal agente isolado na criptococose humana, podendo variar dependendo da região geográfica e presença ou tipo de imunodepressão. Em países europeus e América do Norte observa-se uma grande prevalência do complexo *C. neoformans*, principalmente em pacientes com deficiência da imunidade celular, com menor ocorrência de *C. gattii*. Mesmo em regiões sabidamente endêmicas para o complexo *C. gattii*, como a Austrália, 84% dos isolados em pacientes com AIDS são de *C. neoformans*<sup>(77)</sup>, demonstrando ser um patógeno oportunista. Em regiões tropicais e subtropicais, além da ocorrência cosmopolita do *C. neoformans*, documenta-se a presença do *C. gattii* causando doença em 58 a 84% dos pacientes imunocompetentes, sugerindo que essa espécie se comporta como um patógeno verdadeiro.<sup>(77, 97)</sup> Entretanto, recentes dados de ecoepidemiologia do complexo *C. gattii*, como distribuição desse agente na Europa baseado em mudanças climáticas<sup>(33)</sup>, relatos de casuísticas do oriente com quase total predominância de *C. neoformans* em pacientes imunocompetentes<sup>(98-100)</sup> associadas ao surto de *C. gattii* descrito na ilha de Vancouver<sup>(28)</sup> com disseminação

para o noroeste dos EUA<sup>(62)</sup>, estão modificando esse padrão de distribuição das espécies causadoras de criptococose e a população atingida. Com relação aos dados da China, Japão e Coréia, observa-se que, em alguns pacientes que eram considerados imunocompetentes e desenvolveram neurocriptococose, foram identificados auto-anticorpos contra fatores de estimulação de colônia de granulócitos-macrófagos como fator importante responsável pela doença que podem mudar a epidemiologia dessa doença.<sup>(101)</sup> Finalmente, os genótipos VGIII e VGIV são comumente associados à criptococose em pacientes com AIDS globalmente (VGIII) ou na África, Índia, Europa e América do Sul (VGIV).<sup>(14, 22)</sup>

A criptococose ocorre principalmente em homens adultos entre a terceira e a sexta década de vida, sendo raro no grupo pediátrico.<sup>(74, 76, 77)</sup> Entretanto, estudos nacionais de Darze et al. (2000) e Correa Mdo et al. (1999) descrevem uma alta frequência dessa infecção em crianças do Nordeste e Norte brasileiro.<sup>(102, 103)</sup>

### 1.1.3. Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da criptococose são bem variadas, dependendo do grau e tipo de imunodepressão do hospedeiro, sendo que em pacientes portadores de imunodeficiências graves, a criptococose costuma apresentar-se como doença disseminada. Os principais órgãos acometidos são o SNC e os pulmões, porém a pele, a próstata, o sistema osteoarticular e os olhos, são outros órgãos de importância nessa micose.<sup>(2, 104)</sup> Um dos principais sintomas de infecção é a febre, porém esta pode estar ausente em até 44% dos pacientes.<sup>(93, 105)</sup>

O principal órgão acometido é o SNC, manifestando-se geralmente como uma meningite ou meningoencefalite aguda, subaguda ou crônica, caracterizada por cefaleia, febre, alteração do nível de consciência, confusão mental, perda da memória, letargia, convulsão e coma.<sup>(2, 105-108)</sup> O exame físico geralmente é normal, exceto por rigidez de nuca, que se manifesta no máximo em 40% dos pacientes HIV positivos.<sup>(108)</sup> As principais complicações encontradas são hipertensão intracraniana, hidrocefalia e, menos frequentemente, a paralisia de pares cranianos.<sup>(2)</sup> O líquido cefalorraquidiano (LCR) geralmente apresenta discreta pleocitose, à custa de células linfomonocitárias, hipoglicorraquia, hiperproteínorraquia e pressão de abertura aumentada. Alterações no diagnóstico por imagem do SNC podem ocorrer em até

50% dos casos, sendo constituído basicamente de hidrocefalia, realce meníngeo ou nódulos únicos ou múltiplos. Como esperado, a resolução da ressonância magnética permite identificar maior número de paciente com lesão do SNC quando comparado com a tomografia.<sup>(79)</sup>

O segundo órgão mais acometido é o pulmão. Nos pacientes imunocompetentes, em 1/3 dos casos a infecção pulmonar é assintomática<sup>(109)</sup>, sendo a descoberta da micose resultado de achado radiológico de exames de rotina. Eventualmente, ocorrem manifestações clínicas diversas como: tosse seca, febre, dor pleural, hemoptise e emagrecimento. Os sintomas têm instalação insidiosa, com duração de semanas ou meses. O envolvimento pulmonar, avaliado na radiografia de tórax, pode demonstrar nódulos pulmonares, infiltrados intersticial e/ou alveolar, localizados ou difusos e menos frequentemente cavitações. Linfadenomegalia hilar e, ocasionalmente, derrame pleural podem estar presentes. Nos pacientes com AIDS, o comprometimento pulmonar parece menos frequente.<sup>(93, 105, 108)</sup> Hajjeh et al. (1999) observaram que somente 6% dos pacientes HIV positivos apresentavam pneumonia criptocócica isolada, comparado com 29% dos pacientes não infectados pelo HIV.<sup>(74)</sup> Pacientes imunodeprimidos apresentam quadro geralmente agudo acompanhado de sintomas como febre, dispneia, dor pleurítica, perda de peso, sudorese noturna, tosse e hemoptise, podendo disseminar ou evoluir para insuficiência respiratória, numa proporção maior que os pacientes imunocompetentes.<sup>(110)</sup> Quanto aos exames de imagem, os pacientes imunossuprimidos apresentam mais frequentemente nódulos com cavitações, infiltrado alveolar extenso e infiltrados intersticiais focais, mas derrame pleural e linfonomegalia hilar também podem ser observados.<sup>(79, 110, 111)</sup> Em alguns hospedeiros, doença pelo complexo *C. gattii* pode se apresentar, mas frequentemente, como doença pulmonar granulomatosa isolada, sendo a disseminação, fungemia ou invasão do SNC menos comum quando comparado com o complexo *C. neoformans*.<sup>(112-114)</sup>

O comprometimento cutâneo pleomórfico ocorre em 5 a 30 % dos casos, podendo ser manifestado por lesões acneiformes ou herpetiformes, púrpuras, pápulas umbilicadas, granulomas, fístulas, nódulos, lesões tumorais e celulites.<sup>(115-117)</sup> Esse comprometimento geralmente evidencia disseminação, principalmente em pacientes com deficiência da imunidade.<sup>(118)</sup> Murakawa et al. (1996) realizaram uma revisão da literatura em pacientes com AIDS, relatando a presença de

comprometimento cutâneo em 6% dos casos e 54% apresentavam lesão mimetizando o molusco contagioso.<sup>(119)</sup> Vale ressaltar que a criptococose cutânea primária é considerada uma síndrome distinta, mais frequentemente descrita na França, em pacientes idosos da região rural, que se manifesta geralmente como uma lesão única por inoculação direta e está associado ao *C. neoformans* sorotipo D.<sup>(120)</sup>

O envolvimento esquelético nessa micose parece ser pouco frequente na maioria das séries. Geralmente é confinado a um único osso, havendo predileção por proeminências ósseas, acometendo mais comumente as vértebras. O comprometimento articular é menos frequente, sendo a articulação do joelho a mais observada nos casos relatados.<sup>(121, 122)</sup>

O envolvimento da próstata parece ser relativamente frequente, particularmente em portadores de HIV e sugere que a próstata pode atuar como reservatório do fungo em futuras recorrências da doença.<sup>(123, 124)</sup> Finalmente, também podem ser acometidos na criptococose: adrenal, olho, fígado, sistema fagocítico mononuclear, trato digestivo, músculo, coração, tireoide, testículos e mama.<sup>(125)</sup>

Mais recentemente, observam-se publicações referentes à síndrome inflamatória da reconstituição imune (SIRI) na criptococose, que corresponde a uma resposta inflamatória patológica exuberante a uma terapia ou conduta realizada. A SIRI é descrita em 15 a 30% nos pacientes recentemente diagnosticados com AIDS que iniciam HAART precocemente e, conseqüentemente, apresentam reconstituição imune e resposta virológica, com uma mortalidade de 20 a 86%. O aparecimento das manifestações clínicas associadas a SIRI, na maioria das vezes, ocorre com uma a 12 meses após início do HAART. As manifestações não usuais observadas são miosite, celulite, abscessos e linfonodomegalia. Culturas negativas e redução do antígeno específico observado nessa síndrome são essenciais para o diagnóstico diferencial com outras doenças.<sup>(108, 126-132)</sup>

#### **1.1.4. Diagnóstico**

O diagnóstico laboratorial da criptococose é realizado por meio de pesquisa direta do agente em fluido biológico, pesquisa de antígeno capsular criptocócico, cultura e exame anatomopatológico, na qual se observam leveduras de 2 a 20 µm de diâmetro sem brotamento ou unibrotantes com base afilada.<sup>(2)</sup> O teste de

pesquisa direta de tinta da China é imprescindível na análise do líquido, porém até 14% de pacientes com AIDS e 50% dos pacientes submetidos a transplante de órgãos podem apresentar esse exame falso negativo<sup>(105, 133-135)</sup>, por ser um exame baseado na experiência do observador e existirem relatos na literatura de falso negativo em infecções por leveduras com cápsula deficiente.<sup>(136, 137)</sup> A pesquisa de anticorpos séricos não é um exame útil para o diagnóstico da criptococose, apresentando baixa sensibilidade e especificidade e resultados conflitantes. Ao contrário, a pesquisa de antígeno específico capsular, é um método de grande utilidade no diagnóstico da criptococose, apresentando alta sensibilidade (93 a 100%) e especificidade de 93 a 98%.<sup>(138, 139)</sup> A pesquisa de antígeno criptocócico pode ser realizada por prova de aglutinação do látex, ensaios imunoenzimáticos ou imunocromatográfico ("lateral flow assay"), tendo, esse último, sensibilidade e especificidade no sangue de 97,6% e 98,1% e no LCR de 98,9% e 98,9%, respectivamente. Essa melhor sensibilidade é observada principalmente para as espécies de *C. gattii*.<sup>(140-142)</sup> Outras vantagens dessa nova técnica são a rapidez na realização, necessidade de mínima infraestrutura, estabilidade na temperatura ambiente e baixo custo. A presença desse antígeno pode ser detectada em vários fluidos orgânicos, como LCR, lavado bronco-alveolar, líquido sinovial, líquido peritoneal e sangue, porém é padronizado somente para sangue e líquido.<sup>(143)</sup> A positividade pode antecipar a doença em pacientes assintomáticos com uma mediana de 22 dias<sup>(144)</sup> e geralmente apresenta titulação alta em pacientes com disseminação.<sup>(2, 140, 141)</sup> É importante ressaltar que existem relatos de falso positivo principalmente com fator reumatoide, infecção sistêmica por *Trichosporon* spp., *Mucor circinelloides*, *Alternaria alternata*, *Schizophyllum commune*, *Coprinopsis cinerea*, aspergilose, paracoccidioidomicose e na ocorrência de erro de técnica, porém com titulação baixa.<sup>(2, 145, 146)</sup> Apesar de o antígeno inicial ter um importante valor prognóstico e correlacionar com a carga fúngica<sup>(147)</sup>, a pesquisa de antígeno no LCR e no sangue não é ferramenta precisa para acompanhamento e decisão terapêutica já que fragmentos da cápsula podem demorar a serem clareados do líquido ou sangue, mantendo títulos positivos de antígeno por anos, não diferenciando bem a resposta clínica da persistência da doença.<sup>(110, 113, 148, 149)</sup> Outra grande utilidade dessa ferramenta é a sua utilização como terapia preemptiva em paciente assintomáticos com AIDS e com dosagem de linfócito CD<sub>4</sub> menor que 100 células/mm<sup>3</sup>.<sup>(63)</sup> Mais recentemente, diferentes grupos tem sugerido mesmo em

pacientes com CD<sub>4</sub> menor que 200 células/mm<sup>3</sup>, em regiões com alta prevalência, essa estratégia também pode ser custo-benéfico. Estudos de prevalência descrevem que 6% desse grupo de pacientes apresentam antígeno positivo e essa estratégia terapêutica preemptiva é custo-efetiva.<sup>(150-152)</sup>

O isolamento do fungo em cultura de amostras clínicas é muito importante para assegurar a identificação, genotipagem e realização de teste de sensibilidade do fungo. A cultura do LCR é a que apresenta maior sensibilidade, variando de 66 a 98% de positividade a depender da população de risco analisada.<sup>(77, 105, 133)</sup> Hemocultura, urocultura e cultura de biopsia também podem ser úteis no isolamento do agente, sendo a fungemia documentada em 10 a 90% dos casos a depender da doença de base.<sup>(77, 108, 133)</sup> O exame anatomopatológico é de grande utilidade para fragmentos pulmonares, ósseos e tegumentares, principalmente quando utilizada a coloração específica com mucicarmim de Mayer para visualização da cápsula.<sup>(2)</sup>

É importante destacar que na documentação de fungo em um órgão, é essencial investigar disseminação da doença independente de sintomas com coleta de líquido, principalmente em pacientes imunodeprimidos, hemocultura, urocultura, antígeno específico sérico e líquido e imagem pulmonar e craniana.<sup>(5, 149, 153)</sup>

### 1.1.5. Tratamento

Os regimes terapêuticos sofrem variações dependendo do sítio acometido, do estado imunológico do indivíduo e da gravidade da infecção. As alternativas terapêuticas disponíveis são: anfotericina B (AMB) desoxicolato; associação de AMB e 5-fluorocitosina (5FC); uso de triazólicos isolados ou em associação com 5FC, de preferência fluconazol e formulações lipídicas de AMB.<sup>(149, 153)</sup> Equinocandinas não tem ação contra o *Cryptococcus* spp.<sup>(154)</sup> e o voriconazol e o posaconazol não têm validação clínica, sendo reportadas somente séries de casos tratados com esses medicamentos.<sup>(155)</sup> O isavuconazol, triazólico de segunda geração, tem atividade contra o *Cryptococcus* spp. e estudo não randomizado fase III reportou sucesso terapêutico em seis de nove (67%) pacientes intolerantes ou com doença refratária a outros antifúngicos.<sup>(156)</sup>

Atualmente as estratégias terapêuticas na criptococose se baseiam nas recomendações da publicação da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas<sup>(149)</sup>



e no Consenso de Criptococose da Sociedade Brasileira de Infectologia.<sup>(153)</sup> AMB é considerada a principal droga para tratamento da criptococose, tendo sido utilizada com sucesso em todas as formas clínicas da doença, mas a sua elevada toxicidade, principalmente renal, muitas vezes limita a indicação.<sup>(153)</sup> O uso combinado de 5FC e AMB permite negativação de cultura de LCR mais rápida quando comparada ao uso isolado de AMB ou fluconazol, fenômeno que se correlaciona com uma menor mortalidade dos pacientes com neurocriptococose.<sup>(157-159)</sup> Fundamentalmente, neurocriptococose e doença disseminada devem ser tratadas com a associação de formulações de AMB com 5FC por no mínimo de duas semanas, seguido de consolidação e manutenção com fluconazol por seis a 12 meses a depender da apresentação clínica e tipo de imunossupressão.<sup>(149, 153)</sup>

Formas moderadas a leves de comprometimento extraneural sem disseminação podem ser tratadas desde o diagnóstico com fluconazol por seis a 12 meses. A resposta clínica durante o tratamento deve ser avaliada pela melhora dos sinais e sintomas, principalmente da hipertensão intracraniana; cultura do LCR e imagem.<sup>(149, 153)</sup>

Em torno de 54% dos pacientes com neurocriptococose podem desenvolver hipertensão intracraniana, com aumento do risco de morbidade e mortalidade<sup>(160, 161)</sup> Medidas coadjuvantes da meningite criptocócica incluem manejo adequado da hipertensão intracraniana e da hidrocefalia com punções diária até estabilização da pressão e melhora dos sintomas por pelo menos dois dias.<sup>(149, 153, 162)</sup> A associação de corticosteroides, manitol ou acetozolamida ao antifúngico demonstrou, em estudos randomizados, serem mais tóxicos que a terapia convencional e não reduziram a mortalidade dos pacientes.<sup>(163, 164)</sup>

A maioria dos casos de SIRS não necessita de tratamento específico. Entretanto, nas formas graves, como meningite com hipertensão intracraniana, recomenda-se doses altas de corticosteroides.<sup>(149, 165-168)</sup>

## **1.2. Criptococose e transplante renal**

O TOS é atualmente uma opção terapêutica em muitas doenças humanas<sup>(169)</sup>, aumentando a incidência de indivíduos imunodeprimidos no mundo. Desde o primeiro transplante renal realizado em humanos em 1954, a taxa anual de

transplantes vem aumentando exponencialmente. Dados norte-americanos fornecidos pela United Network for Organ Sharing (UNOS) descrevem um aumento importante dos registros de transplante, na qual ocorreram 33.610 TOS em 2016, sendo 19.859 transplantes renais (56,7%). Desses transplantes renais de 2016, 72% foram transplantes com doador falecido.<sup>(170)</sup> Em contrapartida no Brasil, em 2017, foram realizados 8.642 TOS, número que vem aumentando a cada ano. O transplante renal é o transplante de órgãos mais frequente, responsável por 69% dos TOS.<sup>(171)</sup> No programa de transplante da Fundação Oswaldo Ramos/Hospital do Rim foram realizados 936 transplantes em 2016, na qual 73% são de doador falecido e a sobrevida do paciente e do enxerto de um ano é acima de 90%.<sup>(172)</sup>

A qualidade de vida e taxa de sobrevida no transplante vem melhorando principalmente pelo aperfeiçoamento das técnicas cirúrgicas, terapia imunossupressora e melhor manejo clínico desses pacientes. Segundo dados da UNOS dos EUA, a sobrevida do paciente no primeiro ano de vida após o transplante renal é acima de 95%.<sup>(170)</sup> Já no Brasil, no ano de 2017, 97% dos pacientes submetidos a transplante renal com doador vivo estavam vivos em 1 ano e também sobreviveram 92% dos pacientes envolvendo transplante com doador falecido.<sup>(171)</sup> Apesar disso, as complicações infecciosas é a segunda causa de morte durante o período pós-transplante<sup>(173)</sup> e importante causa de perda do enxerto.<sup>(174)</sup>

Apesar da larga experiência brasileira em transplantes renais, poucos dados sobre infecção fúngica são encontrados no nosso meio, particularmente em relação à criptococose. A primeira publicação brasileira na literatura médica internacional de criptococose em transplante renal foi realizada em 1976, na qual Ferraz et al. (1976) descrevem um caso de criptococose disseminada “pós-morte” em uma menina de 11 anos de idade após três meses do transplante.<sup>(175)</sup> Posteriormente, o grupo da Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade do Estado de São Paulo – SP publicou dois artigos abordando a experiência terapêutica com 17 casos de neurocriptococose em pacientes submetidos a transplante renal.<sup>(176, 177)</sup>

A criptococose é responsável por 7 a 8% das infecções fúngicas invasivas em TOS no mundo, sendo a terceira causa de infecção fúngica invasiva no transplante de órgão sólido no mundo e a segunda em transplante renal.<sup>(178-181)</sup> Um estudo recente do Rio de Janeiro, descreveu a criptococose como a principal causa de doença fúngica invasiva em pacientes submetidos a transplante renal, responsável

por 37,2% das micoses.<sup>(182)</sup> De fato, a prevalência da criptococose em pacientes submetidos a transplante renal varia de 0,3 a 5,8 %.<sup>(134, 178, 179, 182-192)</sup> Além do que, nessas casuísticas de pacientes submetidos a TOS com criptococose, em torno de 50% dos pacientes são receptores de transplante renal.<sup>(88, 94, 96, 133, 179, 180, 185, 193-196)</sup>

Existem poucos dados sobre distribuição das espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* em pacientes submetidos a TOS.<sup>(44, 59, 186, 197-200)</sup> Uma serie de casos da China relata nove casos de *C. neoformans* genótipo VNI em pacientes submetidos a transplante renal<sup>(186)</sup> e existem três relatos de casos de *C. gattii* em transplante.<sup>(197-199)</sup> Além disso, um estudo nacional, do Rio Grande do Sul, reportou quatro casos do genótipo VNII em pacientes submetidos a TOS.<sup>(200)</sup> Entretanto, o estudo que melhor descreve infecção por *C. gattii* em TOS é de Forrest et al. (2015), que é correlacionado ao surto desse agente no Noroeste Pacífico dos EUA, na qual 18% dos isolados foram *C. gattii*. Nesse estudo, dos 11 isolados, 10 foram identificados como VGII e um como VGI, sendo sete provenientes de transplantados renais.<sup>(199)</sup>

A criptococose é considerada uma infecção tardia, com aparecimento após um ano do transplante em mais que 70% das casuísticas. A mediana de aparecimento após o transplante varia de 13 a 48 meses, sendo mais precoce no transplante de pulmão e fígado.<sup>(88, 133, 134, 178-180, 184, 185, 187, 189, 190, 196)</sup> Pacientes transplantados podem ser infectados através de órgão transplantado<sup>(70, 73)</sup> ou após exposição ao fungo no ambiente.<sup>(68)</sup> O momento que a criptococose ocorre, logo após a infecção ou através de reativação de um foco latente, é um tema ainda controverso na literatura. A maioria dos autores sugere a reativação da infecção como o principal mecanismo da doença.<sup>(133, 201)</sup> Entretanto, casos precoces de criptococose são reportados, possivelmente decorrentes de uma doença não diagnosticada no receptor ou doador antes do transplante ou num cenário de alta exposição ambiental.<sup>(202, 203)</sup>

Os fatores de risco para a criptococose ainda não estão bem estabelecidos.<sup>(134)</sup> O principal fator de risco é, provavelmente, a utilização de medicações imunossupressoras, principalmente corticosteroides, globulina antitímócito e alemtuzumabe<sup>(204-206)</sup>, que deprimem a imunidade celular, resposta imune essencial para conter a infecção. Outros fatores descritos são a uremia, a infecção viral crônica e a disfunção do enxerto.<sup>(207, 208)</sup> Em estudo recente, utilizando

grande volume de dados, foram encontradas diabetes mellitus e idade avançada como fatores de risco para criptococose em análise multivariada.<sup>(185)</sup>

Os imunossupressores utilizados para o transplante, em especial os inibidores de calcineurina, além de serem condição de risco para criptococose, parecem modular a apresentação clínica da criptococose e impactar na sobrevida dos pacientes submetidos a TOS.<sup>(94, 133, 134, 209)</sup> A apresentação clínica pulmonar isolada e tegumentar/osteoarticular são mais frequentes em pacientes submetidos a TOS com esses imunossupressores<sup>(133, 134)</sup>, possivelmente, devido a ação fungicida dependente de temperatura observado por esses medicamentos.<sup>(209-211)</sup>

As medicações imunossupressoras atenuarem os sinais e sintomas das infecções<sup>(212)</sup>, portanto, pacientes submetidos a TOS com criptococose nem sempre apresentam febre. Por exemplo, esse sintoma pode estar ausente em 25 a 60% dos casos de criptococose e até 64% dos pacientes com comprometimento pulmonar isolado.<sup>(96, 134, 196, 213-215)</sup> O comprometimento do SNC é o mais frequente, acometendo 42 a 75% dos pacientes<sup>(88, 94-96, 133, 168, 178, 179, 185, 187, 190-192, 194, 196, 216)</sup> e em torno de 22 a 75% dos pacientes apresentam hipertensão intracraniana.<sup>(88, 96, 183, 186, 217)</sup> O segundo órgão mais afetado é o pulmão, sendo acometido em 38 a 65% dos pacientes transplantados, porém em torno de 37 a 63% dos pacientes esse comprometimento é isolado.<sup>(88, 95, 96, 111, 133, 168, 179, 184, 185, 187, 194, 196)</sup> O comprometimento tegumentar é o terceiro mais comum da criptococose no TOS, acometendo 8 a 26% e sendo a celulite, mimetizando infecção bacteriana, responsável por 30% dos casos.<sup>(95, 96, 133, 168, 182, 183, 186, 187, 190, 192, 194, 196)</sup> Por fim, a fungemia é descrita em 21 a 36,8% dos pacientes<sup>(88, 96, 133, 168, 194, 196)</sup> e doença disseminada é reportada em 24 a 61%.<sup>(133, 184, 196, 216)</sup>

Em relação ao diagnóstico, a tinta da China é positiva em 50 a 80% dos pacientes transplantados de órgãos<sup>(134, 135, 189)</sup> e a cultura do líquido é descrita como positiva em 77 a 83% dos casos de TOS.<sup>(133-135, 194, 216, 218)</sup> A pesquisa de antígeno específico no LCR também apresenta alta sensibilidade nessa população, sendo positivo em 98 a 100% dos casos de meningite<sup>(134, 135, 184, 189, 218)</sup>, fundamentando a triagem com pesquisa de antígeno. A positividade do antígeno criptocócico sérico também é alta no TOS, sendo em torno de 82% nos casos de criptococose<sup>(168, 196, 218)</sup> e de 91 a 97,5% nos casos de neurocriptococose.<sup>(135, 218)</sup> Entretanto, esse exame apresenta limitação na sua sensibilidade no comprometimento pulmonar isolado no TOS, particularmente no transplante pulmonar. São descritos resultados negativos

em 27 a 60% dos pacientes com criptococose pulmonar isolada em TOS.<sup>(111, 184)</sup> Portanto, o antígeno sérico negativo não exclui infecção do SNC<sup>(196)</sup> e, consequentemente, recomenda-se a coleta de LCR em todos os pacientes imunodeprimidos.<sup>(149)</sup> Entretanto, um estudo norte-americano descreve que foi coletado LCR somente em 75% dos casos de criptococose em TOS, com uma pior taxa de mortalidade nos pacientes que não coletaram quando comparado com os que realizaram o exame.<sup>(196)</sup>

Todos os pacientes submetidos a TOS requerem tratamento específico para a criptococose, devido ao alto risco de progressão e mortalidade. O tratamento da infecção invasiva nesses pacientes continua sendo um grande desafio, particularmente em erradicar a infecção, preservando a função do enxerto e evitando as reações adversas advindas da interação medicamentosa. A terapia antifúngica ideal para o tratamento da criptococose nos pacientes submetidos a TOS foi pouco estudada, sendo a maioria das recomendações baseadas nas evidências de pacientes com AIDS e em alguns trabalhos retrospectivos.<sup>(149, 153, 219)</sup>

Os poucos estudos comparativos disponíveis na literatura sobre eficácia e segurança das formulações lipídicas de AMB em criptococose mostram que tais drogas apresentam menor toxicidade e a mesma eficácia clínica que a formulação de AMB desoxicolato.<sup>(216, 220, 221)</sup> O uso clínico das formulações lipídicas de AMB é limitado pelo seu custo, sendo na maioria dos serviços utilizada em pacientes intolerantes ou refratários à AMB convencional. Recentemente foi publicada uma revisão da literatura de criptococose em transplante com 507 casos, na qual pacientes tratados com formulações lipídicas de AMB apresentaram significativamente menor mortalidade dos que utilizaram AMB desoxicolato.<sup>(216)</sup> O mesmo grupo de pesquisadores realizou um estudo prospectivo em 75 pacientes submetidos a TOS com neurocriptococose e descreveram diminuição de seis vezes da mortalidade de 90 dias em pacientes que utilizaram formulações lipídicas de AMB quando comparados com aqueles que utilizaram AMB convencional, mesmo após ajustado para disfunção renal admissional e fungemia.<sup>(221)</sup> Devido a esses estudos, a recomendação no tratamento da neurocriptococose ou doença disseminada em transplantados de órgãos é a utilização de anfotericina B lipossomal (3 a 4 mg/Kg/dia), anfotericina B complexo lipídico (5 mg/kg/dia) ou AMB desoxicolato (0,7 a 1 mg/kg/dia) associado a 5FC (100mg/kg/dia) por no mínimo de 14 dias, se função renal preservado.<sup>(149, 153, 206, 216, 222)</sup> Como no paciente com AIDS, recomenda-se o

prolongamento da terapia de indução com AMB por 4 a 6 semanas na ausência de 5FC. Pacientes com comprometimento extraneural leve a moderado, na qual foi excluído disseminação, a utilização de fluconazol 400 mg/dia é recomendada.<sup>(149, 153, 206)</sup> Vale ressaltar que a mediana de tempo para a esterilização da cultura no LCR é de 10 dias (média de 16 dias) em TOS<sup>(218)</sup> e 36 a 63% dos pacientes podem apresentar cultura positiva no LCR com 14 dias de tratamento, sendo maior quando utilizado AMB desoxicolato.<sup>(218, 221)</sup>

A utilização de terapia subsequente à terapia inicial é recomendada, com base em evidências de maior sobrevida dos pacientes e baixas taxas de recidiva da doença. Essa última é de 1,3 a 19% dos casos, com mediana de 3,5 meses após o início da infecção e, geralmente, não ultrapassa um ano.<sup>(189, 192, 194)</sup> A duração da terapia de consolidação e a mudança para terapia de manutenção são temas controversos na literatura. Entretanto, recomenda-se terapia de consolidação com fluconazol (400 a 800mg/dia) por oito semanas, seguido de manutenção com fluconazol (200 a 400mg/dia) por 6 a 12 meses após o diagnóstico da criptococose.<sup>(149, 206)</sup>

Um cuidado adicional no tratamento da criptococose nos pacientes transplantados renais é com a insuficiência renal aguda resultante da utilização da AMB desoxicolato, que é descrita em até 33,2%, mesmo em pacientes não transplantados e 4,8% podem necessitar de descontinuação pelo evento adverso relacionado à droga.<sup>(223)</sup> Em um estudo mais recente, os autores descreveram 11,5% de nefrotoxicidade grave nos pacientes utilizando AMB desoxicolato, sendo a utilização de AMB lipossomal um fator protetor para nefrotoxicidade grave e mortalidade.<sup>(224)</sup> Os pacientes transplantados, além de apresentarem um único rim, geralmente estão desnutridos, com alto risco de pielonefrite e rejeições do enxerto e apresentam creatinina basal elevada, sendo a manutenção da função renal o principal objetivo do médico transplantador. Além disso, geralmente recebem outros agentes nefrotóxicos, como, inibidores de calcineurina, vancomicina, aminoglicosídeos e sulfametoxazol/timetoprim. Por esse motivo, 26 a 38% dos pacientes submetidos as TOS já apresentam disfunção renal no momento do diagnóstico.<sup>(88, 94, 133, 196, 221)</sup> Por outro lado, a nefrotoxicidade associada à AMB em pacientes submetidos a TOS é pouco descrito da literatura.<sup>(189, 190, 192, 221, 225-227)</sup> Um estudo retrospectivo com pacientes transplantados de órgão sólidos com aspergilose reportou que 15 de 42 (36%) pacientes apresentaram creatinina sérica acima que

2,5 mg/dL após iniciarem AMB desoxicolato sendo que 18% necessitaram de hemodiálise.<sup>(226)</sup> Já em estudos de criptococose em transplante de rim, a taxa de disfunção de enxerto reportada varia de 14 a 33%, com significativa perda de enxerto de 7 a 13% com uso de desse antifúngico.<sup>(189, 190, 192, 221, 225)</sup>

Interesse progressivo vem sendo despertado em relação à SIRS nos pacientes submetidos a TOS, que é definido como uma deterioração clínica paradoxal atribuída à recuperação da resposta imune após diminuição da imunossupressão e início de terapia antifúngica.<sup>(167)</sup> É uma síndrome rara, estimada em 5 a 15% dos pacientes submetidos a TOS após 14 dias a oito meses do início do antifúngico e redução da imunossupressão.<sup>(168, 228, 229)</sup> Além disso, em pacientes transplantados renais a SIRS pode contribuir para perda do enxerto renal<sup>(229, 230)</sup> e a mortalidade é de 5-15%.<sup>(168, 230)</sup> O diagnóstico é de exclusão e muitas vezes difícil de diferenciar da recidiva da doença, sendo as culturas negativas, reação liquórica mais exuberante e a diminuição do antígeno criptocócico, indícios primordiais para o diagnóstico da SIRS.<sup>(167)</sup> Os fatores de risco da SIRS em TOS descritos são neurocriptococose (razão de chance de 8,43), descontinuação do inibidor de calcineurina (razão de chance de 6,88) e doença disseminada (razão de chance de 11,38). Em contrapartida, o fator protetor da síndrome é a doença pulmonar isolada (razão de chance de 0,10).<sup>(168)</sup>

A redução da imunossupressão é realizada em torno de 58%<sup>(194)</sup>, porém a melhor estratégia para essa redução não é consenso e, conseqüentemente, deve ser individualizada.<sup>(117, 202, 206)</sup> O manejo da imunossupressão sempre deve ser realizado em conjunto com o nefrologista ou médico transplantador. A redução deve ser gradual para evitar a SIRS descrita acima e rejeição aguda do enxerto. Recomenda-se a suspensão completa da imunossupressão nos primeiros dias de tratamento, só mantendo o corticoide de manutenção, nos pacientes com comprometimento grave do SNC (rebaixamento do nível de consciência ou pacientes apresentando hipertensão intracraniana), infecção disseminada ou comprometimento pulmonar com insuficiência respiratória. Nos pacientes com comprometimentos menos grave do SNC e criptococose pulmonar leve a moderada, recomenda-se a redução da imunossupressão, constituída de suspensão de um imunossupressor ou redução da dose de todas as medicações do esquema.<sup>(153)</sup> Baseado nos dados de Sun et al. (2015), recomenda-se evitar modificações no inibidor de calcineurina por ser um fator protetor da SIRS.<sup>(168)</sup> Por conseguinte, nas

formas mais leves, como no comprometimento cutâneo ou pulmonar isolado, o esquema pode ser mantido.<sup>(153)</sup>

Um assunto importante é o retransplante em pacientes que apresentaram perda do enxerto após criptococose, devido à ocorrência de criptococose em até 13% nos pacientes retransplantados.<sup>(133, 196, 221)</sup> No transplante renal, que se pode realizar tratamento dialítico, recomenda-se um ano de antifúngico, ausência de sinais ou sintomas relacionados e culturas negativas para indicar um novo procedimento. Nos outros tipos de transplantes, recomenda-se retransplante somente após a terapia de indução da criptococose, culturas negativas e estabilização ou diminuição do antígeno específico.<sup>(206)</sup>

Infecção é ainda a principal causa de morte em pacientes transplantados de rim na Fundação Oswaldo Ramos/Hospital do Rim<sup>(231)</sup> e, principalmente nas micoses sistêmicas, altas taxas de mortalidades são reportadas.<sup>(179, 180)</sup> A mortalidade na criptococose no paciente submetido a TOS é dependente do grau de comprometimento, variando de 13 a 42%<sup>(94-96, 133, 134, 168, 179, 180, 184, 185, 187, 196)</sup>, sendo ainda maior nos casos de fungemia, disseminação e meningite criptocócica<sup>(133, 135, 184, 218)</sup> e menor no comprometimento pulmonar<sup>(133, 184, 215)</sup> e nas publicações mais recentes em países desenvolvidos.<sup>(94, 95, 133, 179, 185, 187, 196)</sup> Já em pacientes submetidos a transplante renal a mortalidade global varia de 23 a 76%.<sup>(134, 178, 183, 184, 186, 189-192)</sup>

### **1.3. Fatores de virulência e fatores prognósticos**

#### **1.3.1. O papel do agente no desfecho clínico**

Para os complexos *C. neoformans*/*C. gattii* já foram descritos inúmeros fatores de virulência.<sup>(4, 69)</sup> O mais estudado entre eles, a cápsula polissacarídea, é composta em sua grande parte de glucuronoxilomanana (GXM) e protege o fungo contra a desidratação e predadores. No hospedeiro, a produção constante da cápsula é induzida por soro, escassez de ferro, glicose, nitrogênio, pH fisiológico, estresse oxidativo celular e nível de CO<sub>2</sub>. Consequentemente, a cápsula interfere na apresentação de antígenos pelos monócitos, nas citocinas inflamatórias, na proliferação de linfócitos T e na produção de complemento. A cápsula também



funciona como um escudo contra a explosão oxidativa dentro do macrófago, permitindo a latência do fungo dentro do macrófago.<sup>(4, 69, 232)</sup> A GXM e a galactoxilomanana, outro componente da parede celular, também atuam diretamente nas células da imunidade, promovendo apoptose de macrófagos e linfócitos T.<sup>(233)</sup> Tudo isso é regulado por inúmeros genes, permitindo que o fungo elabore essa complexa e dinâmica capsula que torna o principal fator de virulência do fungo.<sup>(4, 232)</sup> Entretanto, a relação da espessura com a virulência é um assunto controverso, sendo mais dependente da adaptação do agente as condições do hospedeiro ou ambiente.<sup>(234)</sup>

Outro importante fator de virulência é a produção da enzima fenoxidase (lacase) que catalisa reações envolvidas na transformação de componentes difenólicos em melanina, estrutura que protege o fungo contra raios ultravioletas no ambiente e contra os radicais livres no hospedeiro.<sup>(4)</sup> Essa enzima é expressa na parede celular quase que exclusivamente quando o agente está no SNC, sendo um dos motivos do tropismo do agente por esse órgão. No hospedeiro a melanina é responsável pela resistência ao ataque dos leucócitos, diminui a proliferação linfocitária e a produção de fator de necrose tumoral, fuga da fagocitose e resistência aos antifúngicos.<sup>(4, 69, 233)</sup>

Alguns mecanismos de sinalização intracelular do fungo têm sido descritos com grande papel na patogênese da criptococose, influenciando intensamente a morfologia e virulência do patógeno. Exemplo disso é a via de sinalização da proteína G que regula o tamanho da cápsula, ciclo sexual, formação de melanina e, conseqüentemente, a virulência do agente. Outras vias de sinalização amplamente estudadas são as proteínas quinases ativadas pelo mitogênio, quinase fosfatidilinositol-3, quinases extracelulares reguladoras de sinal, proteínas Ras, proteína regulatória da família Rho e as enzimas superóxido dismutases.<sup>(4, 233)</sup>

O estudo do ciclo de vida do complexo também é importante para determinar a virulência. A reprodução sexuada entre duas cepas  $\alpha$  -  $\alpha$  contribui para a diversidade genotípica das espécies de *Cryptococcus*, que por sua vez, aumenta o "fitness", virulência do patógeno e sua propagação, sendo assim responsável pelos surtos.<sup>(235)</sup> O "mating type" regula os fatores de virulência do fungo, por exemplo, o "mating type"  $\alpha$  é mais virulento que o "mating type"  $a$  do *C. neoformans* sorotipo D.<sup>(236)</sup> Outro achado interessante, é a descrição que cepas "mating type"  $\alpha$  de *C.*

*neoformans* var. *grubii* disseminam para no SNC mais frequentemente que cepas “mating type” a do mesmo agente.<sup>(237)</sup>

Inúmeros outros fatores de virulência já foram descritos, como: a habilidade do fungo de crescer a 37° C, propiciando a infecção humana; a capacidade de “switching” para colônias gelatinosas, favorecendo a disseminação e latência; presença da fosfolipase B1, um facilitador da invasão pulmonar e a presença da urease, que induz à resposta imune tipo Th2 e invasão do SNC.<sup>(4, 69, 233)</sup>

Como relatado anteriormente, os genomas do complexo *C. neoformans* e *C. gattii*, quando comparados, apresentam diferenças no arranjo cromossômico, que podem determinar diferenças funcionais significativas entre as duas espécies e consequentemente, impactar na patogenia e virulência desses agentes.<sup>(238)</sup> Após a caracterização do surto de *C. gattii* VGII no Canadá, surgiram novos elementos para enriquecer a discussão sobre a diferenciação da virulência entre os isolados dos complexos *C. gattii* e *C. neoformans*.<sup>(239)</sup> Os dois agentes, aparentemente, possuem as mesmas ferramentas de virulência, mas, o nível de expressão gênica e alterações nas modificações pós-translacionais podem influenciar as diferenças da apresentação clínica das infecções por esses agentes. Exemplos de diferenças estruturais e funcionais entre esses complexos podem ser encontradas no estudo da cápsula polissacarídea. Quanto à estrutura, foi descrito diferenças na concentração de xilose e acetilação O do componente polissacarídeo GXM do complexo *C. gattii* e do *C. neoformans*. Já em relação à função da cápsula, a GXM do complexo *C. gattii* tem uma melhor capacidade de inibir a quimiotaxia, resposta das quimiocinas dos neutrófilos e proliferação dos linfócitos T quando comparado ao complexo *C. neoformans*. Diferenças também foram reportadas no gene *MAT* (responsável pela reprodução sexual) e na expressão e estrutura das enzimas superóxido dismutases, fosfolipase, lacase, trealose e da via da proteína G.<sup>(57, 240, 241)</sup>

Essas diferenças acima podem explicar alguns achados clínicos observados entre os dois complexos. Enquanto que o complexo *C. neoformans* causa principalmente infecção no SNC, aproximadamente 70% das infecções *C. gattii* apresentam comprometimento pulmonar.<sup>(77, 242)</sup> Em imunocompetentes, onde a ocorrência do complexo *C. gattii* é mais frequente, o comprometimento do SNC pode se apresentar como uma meningite mais prolongada e com resposta inflamatória mais intensa, com criptococomas únicos ou múltiplos ao exame de imagem e complicar mais frequentemente com hidrocefalia obstrutiva, neuropática cranial e

hipertensão craniana, quando comparado à doença pelo complexo *C. neoformans*.<sup>(104, 113, 243-245)</sup> Mesmo no comprometimento pulmonar, esse agente tende a produzir granulomas maiores.<sup>(240)</sup> Exemplos que a diferenciação entre as espécies pode influenciar na apresentação clínica, são observados no estudo de Ngamskulrungronj et al. (2012).<sup>(112)</sup> Em modelo murino, os autores observaram que isolados de *C. gattii* crescem adequadamente em tecido pulmonar, mas apresentam dificuldades em disseminar e atingir o SNC, diferentemente de cepas de *C. neoformans*.<sup>(112)</sup> Outro achado importante nos isolados do surto de Vancouver foi reportando por Cheng et. al. (2009), na qual esses isolados induziram a uma resposta inflamatória menos protetora no pulmão, suprimindo a migração de neutrófilos e produção de citocinas nesse órgão e predispondo ao comprometimento pulmonar.<sup>(246)</sup>

A caracterização molecular dos complexos *C. neoformans/C. gattii* tem importância na compreensão na estrutura populacional no nível epidemiológico, distribuição dos genótipos, investigação de surtos, identificar infecções resultantes de viagem e análise de isolados sequenciais.<sup>(20, 33, 40, 247)</sup> Entretanto, existem poucos dados na literatura para explicar as diferenças na apresentação clínica entre as espécies dos complexos, menos ainda se conhece o impacto no desfecho clínico dessas espécies (**Tabela 1**). A análise dos isolados de *C. gattii* provenientes do surto da Ilha de Vancouver e do Noroeste dos EUA demonstrou em modelo murino que o tipo molecular VGIIa causa maior mortalidade que o VGIIb.<sup>(248, 249)</sup> Contudo, outros investigadores utilizando *Drosophila melanogaster* constataram que o genótipo VGIII foi o mais virulento do complexo *C. gattii*.<sup>(250)</sup> A virulência desse agente também foi estudada em *Galleria mellonella*, na qual algumas cepas de VGI, VGII e VGIV apresentaram a mesma ou uma maior virulência que as cepas VGIIa do surto.<sup>(251)</sup> Mais recentemente, Hagen et al. (2015) testaram em ratos 12 isolados, dois de cada genótipo principal. Eles constataram que somente três isolados, um de cada diferente genótipo (VNII, VNIV e VGIII), foram extremamente virulentos.<sup>(21)</sup> Outros estudos “in vitro” e “in vivo” também colaboram com a controvérsia sobre a virulência desses diferentes genótipos.<sup>(112, 235, 252-259)</sup>

No que se refere ao impacto dos diferentes genótipos na sobrevivência do paciente, Beale et al. (2015) descreveram maior mortalidade em pacientes sul africanos com AIDS infectados por VNB quando comparado com outras espécies do complexo *C. neoformans* (**Tabela 1**).<sup>(260)</sup> Outros pesquisadores descrevem diferenças

em mortalidades em pacientes infectados por linhagem diferentes, porém dentro do mesmo genótipo.<sup>(59, 261, 262)</sup>

Consequentemente, esses estudos sugerem que pode haver diferenças de virulência entre as cepas, mas a estabilidade dessas diferenças e sua relevância clínica em relação à apresentação da doença e o impacto na mortalidade, são incertos.<sup>(263)</sup>

Infecção mista por dois genótipos diferentes é descrita em 16,7% até 42,1% dos casos de criptococose, apesar de ser, provavelmente, subestimada pela frequente rotina dos laboratórios de estocar uma única colônia do fungo por isolado.<sup>(60, 261, 264-269)</sup> Um estudo interessante, baseado em MLST, descreveu que 11% das amostras sequenciais na África do Sul, são de genótipos diferentes, levantando a hipótese de infecção mista.<sup>(270)</sup> Portanto, esse tipo de infecção pode ocorrer por inoculação concomitante de dois diferentes isolados ou, menos frequente, microevolução “in vivo” e o impacto na apresentação clínica e no prognóstico do paciente ainda está para ser determinada. A mesma lacuna de conhecimento ocorre com os isolados diploides<sup>(256, 264)</sup>, que são descritos em amostras clínica em torno de 9% dos casos de criptococose.<sup>(271-273)</sup>

### 1.3.2. O papel do hospedeiro no desfecho clínico

Apesar do tratamento, altas taxas de mortalidade com essa micose têm sido documentadas, variando de 5,5 a 37% em pacientes adultos portadores de AIDS e podendo ser maior que 50% em regiões do sudoeste da África e em pacientes imunodeprimidos.<sup>(88, 93, 108, 133, 158, 179, 274-278)</sup>

A diferença de virulência entre as espécies não explica por completo as diferenças clínicas e o desfecho dos pacientes com criptococose. A resposta imune do hospedeiro tem um papel primordial nesse desfecho, proporcionando um estresse tecidual importante para influenciar o metabolismo do fungo e definir a apresentação clínica da doença.<sup>(263)</sup> Estudos moleculares de patogêneses sugerem que o complexo *C. neoformans*, dependendo do ambiente em que ele se encontra, expressa diferentes genes que vão ser responsáveis por regular diferentes vias de metabolismo.<sup>(279, 280)</sup>

Existem vários estudos descrevendo os fatores prognósticos criptococose, e esses são relacionados à gravidade da doença de base, capacidade de resposta inflamatória do paciente e carga microbiológica que, assim, determinarão a gravidade da doença. Em pacientes com AIDS são reconhecidas as seguintes variáveis: presença de alteração do nível de consciência, celularidade no LCR < 20 leucócitos/ $\mu$ l, altos títulos de antígeno criptocócicos no LCR, idade avançada, glicorraquia baixa, hipertensão intracraniana, hiponatremia, não uso de 5FC, uso de fluconazol isolado ou dose baixa na indução, carga fúngica no líquido, leucocitose, menor peso, anemia, fungemia, doença disseminada e isolamento extraneural da levedura.<sup>(105, 108, 159, 274, 276, 281-283)</sup> Em pacientes sem HIV, os fatores de mau prognóstico descritos são: tinta da China positiva, hipertensão intracraniana, glicorraquia baixa, celularidade no LCR < 20 leucócitos/ $\mu$ l, isolamento extraneural da levedura, altos títulos séricos ou líquóricos de antígeno criptocócico, uso prévio de corticoterapia, ausência de cefaleia e estado mental alterado no quadro inicial, idade avançada, doença hematológica maligna, imagem radiológica cerebral anormal, fungemia e falência de órgãos.<sup>(93, 96, 195, 197, 204, 219)</sup>

No contexto de TOS, os fatores prognósticos são os relacionados à gravidade da doença e disfunção do órgão: creatinina sérica na admissão maior que 1,5 mg/dL<sup>(134)</sup> ou maior ou igual a 2 mg/dL<sup>(133, 221)</sup>, derrame pleural<sup>(215)</sup> e doença ou falência hepática.<sup>(95, 135)</sup> O transplante de pulmão é independentemente associado à morte na criptococose.<sup>(95)</sup> Em contrapartida, os fatores significativamente relacionados à sobrevida foram à utilização de inibidores de calcineurina na apresentação da doença e a utilização de formulações lipídicas de AMB, como relatado anteriormente.<sup>(133, 221)</sup> Já a confusão mental e ausência de cefaleia foram descrito como sinais de pior prognóstico somente em análise univariada em pacientes com neurocriptococose reportados na literatura até 2001.<sup>(134)</sup>

#### 1.4. Avaliação de resistência e impacto clínico

O teste “*in vitro*” de susceptibilidade a antifúngicos para o complexo foi padronizado pelo “The Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI)<sup>(284)</sup>, porém pontos de cortes clínicos não foram estabelecidos pelo CLSI e nem pelo “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST). Dessa forma, não se

pode categorizar os isolados em sensível, intermediário e resistente. Portanto, para detectar emergência de resistência aos antifúngicos, a metodologia mais utilizada para a interpretação da concentração inibitória mínima (CMI) refere-se aos pontos de cortes epidemiológicos definidos por Espinel-Ingroff et al. (2012), baseado em isolados de tipo selvagem, valores esses também acolhidos pelo CLSI.<sup>(285, 286)</sup>

A correlação entre diferentes genótipos e a susceptibilidade aos antifúngicos é um tema controverso (**Tabela 1**).<sup>(51, 250, 287-291)</sup> Porém, a maioria dos estudos nacionais e de outros países descrevem valores de CIMs para fluconazol significativamente mais altos para o complexo *C. gattii*, principalmente quando analisado o genótipo VGII.<sup>(48, 49, 52, 250, 287, 291-296)</sup> Por exemplo, um estudo brasileiro de Trilles et al. (2012) encontrou menor susceptibilidade aos azólicos de 38 isolados de VGII quando comparados a isolados de VGI e VNI.<sup>(297)</sup> Os mesmos achados foram descritos com os VGII na Austrália e com os isolados responsáveis pelo surto no Canadá e Noroeste dos EUA.<sup>(298, 299)</sup>

Além disso, a correlação entre o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos e resposta clínica ou recorrência da doença ainda é motivo de controvérsia para os complexos *C. neoformans/C. gattii*. A maioria dos estudos reporta o aumento dos valores de CIM para fluconazol de isolados sequenciais em paciente com doença recidivante.<sup>(247, 270, 300-303)</sup> Por outro lado, estudos de série maiores descrevem achados contrários.<sup>(304-309)</sup> Um exemplo interessante é o modelo experimental com *Galleria mellonella* na qual demonstra que isolados de *C. neoformans* com altos valores de CIMs para fluconazol apresentaram menor virulência que isolados com baixos CIMs.<sup>(305)</sup> Achados opostos foram descritos utilizando cepas heterorresistentes inoculadas em ratos, colaborando com a controvérsia sobre o assunto.<sup>(310)</sup>

O perfil de susceptibilidade contra os antifúngicos de isolados de pacientes TOS é raramente reportado.<sup>(55, 186, 199, 311, 312)</sup> Forrest et al. (2015) descreveram valores de CIMs para fluconazol variando de 1 a 32 mg l<sup>-1</sup> de 11 isolados do complexo *C. gattii* em pacientes submetidos a transplante de órgãos.<sup>(199)</sup> Em outro relato de casos foi reportado valores de MICs menores para fluconazol de nove isolados de VNI, variaram de 1 a 8 mg l<sup>-1</sup>.<sup>(186)</sup>

## **2. OBJETIVOS E DELINEAMENTO DO ESTUDO**

---

Nesta tese de doutorado são apresentados dois artigos científicos que corresponde a duas etapas com objetivos diferentes (**Figura 2**).

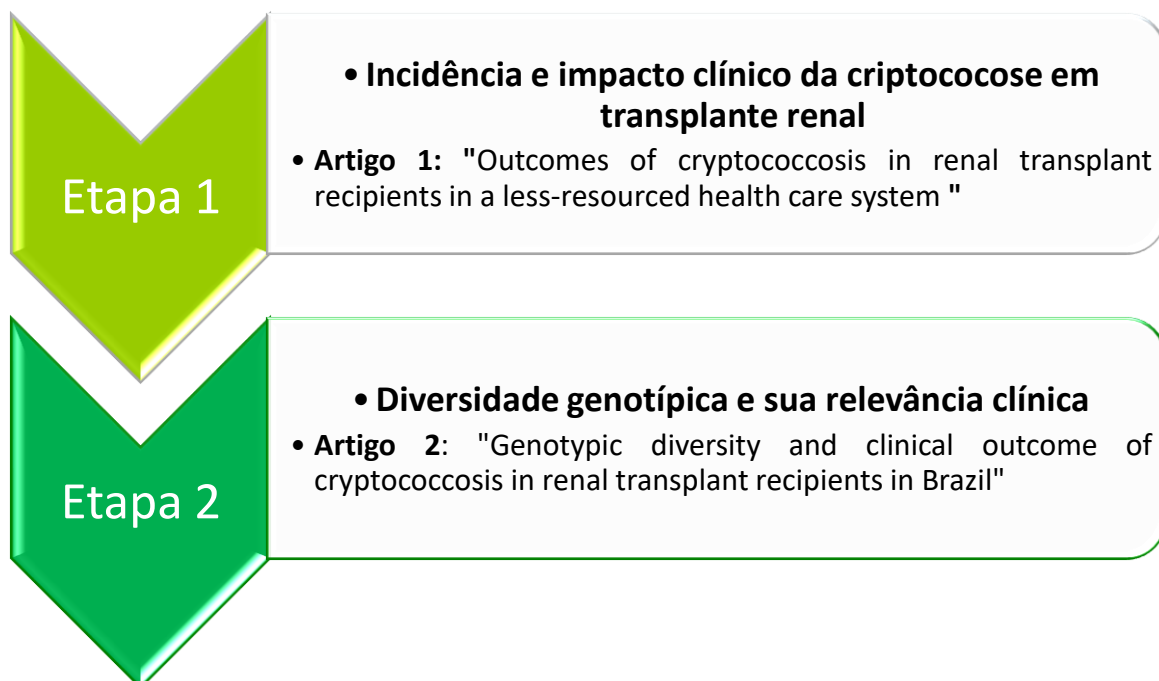


Figura 2 - Fluxograma do delineamento do estudo.

## 2.1 Etapa 1: Incidência e impacto clínico da criptococose em transplante renal

Essa primeira etapa foi elaborada com o objetivo de caracterizar a criptococose em pacientes submetidos a transplante renal nos hospitais do complexo da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina - UNIFESP/EPM (Hospital São Paulo, Hospital do Rim e Hospital de Transplante Dr. Euryclides de Jesus Zerbini). Fez parte dessa etapa a descrição epidemiológica, clínica, identificação dos fatores prognósticos e avaliação a disfunção do enxerto nos pacientes submetidos a TOS que receberam terapia antifúngica para criptococose.

Os casos de criptococose foram retrospectivamente selecionados durante o período de 1987 a 2013, a partir das seguintes fontes:

- Fichas médica de acompanhamento dos pacientes internados no Hospital do Rim pelo grupo da infectologia;



- Resultado do teste de antígeno específico e das culturas positivas para os complexos *C. neoformans*/*C. gattii* realizadas nos laboratórios vinculados aos hospitais desde 1995;
- Levantamento dos diagnósticos associados à criptococose de entrada, saída ou óbito do Hospital São Paulo desde 1995 e Hospital do Rim desde 1998, acessados pelo serviço de arquivo médico vinculado a eles;
- Levantamento dos laudos histopatológicos dos pacientes transplantados desde novembro de 1996.

Definiu-se como caso incidente, todos os indivíduos submetidos a transplante renal que apresentaram pelo menos um dos seguintes critérios diagnósticos de criptococose durante qualquer período pós-transplante ou retransplante<sup>(313, 314)</sup>:

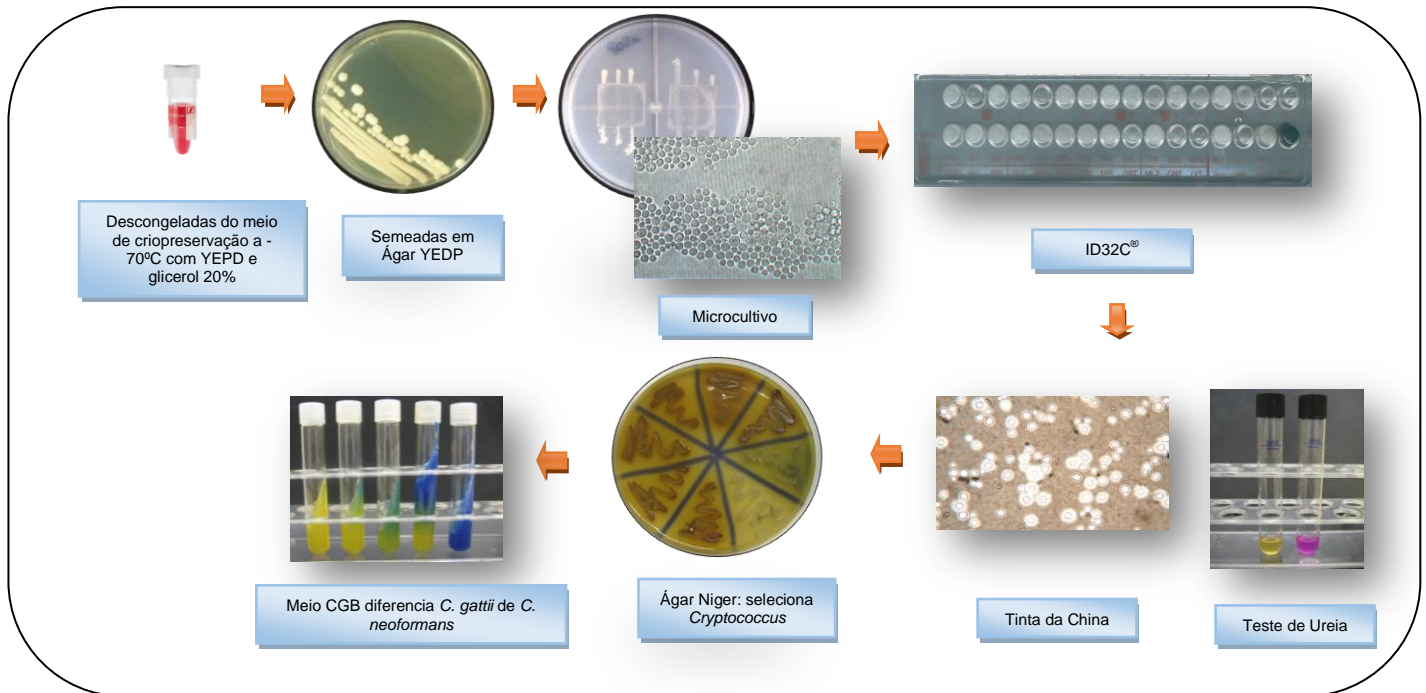
- Cultura positiva do fungo em qualquer fluido ou tecido humano;
- Amostra de LCR ou soro com presença de antígeno criptocócico com titulação superior a 1:8, associado a sinais ou sintomas clínicos compatíveis;
- Amostra de tecido apresentando elementos fúngicos compatíveis com *Cryptococcus* spp. após coloração específica.

A coleta de dados do prontuário foi realizado por ficha clínica padrão (**Apêndice 1**) com as seguintes variáveis: dados demográficos, infecção prévia e concomitante, episódios de rejeição de enxerto, dados do transplante, regimes imunossupressores, dados laboratoriais relevantes e detalhamento do tratamento que incluiu valores de creatinina, duração do tratamento, uso de agentes nefrotóxicos e disfunção do enxerto.

## **2.2 Etapa 2: Diversidade genotípica e sua relevância clínica**

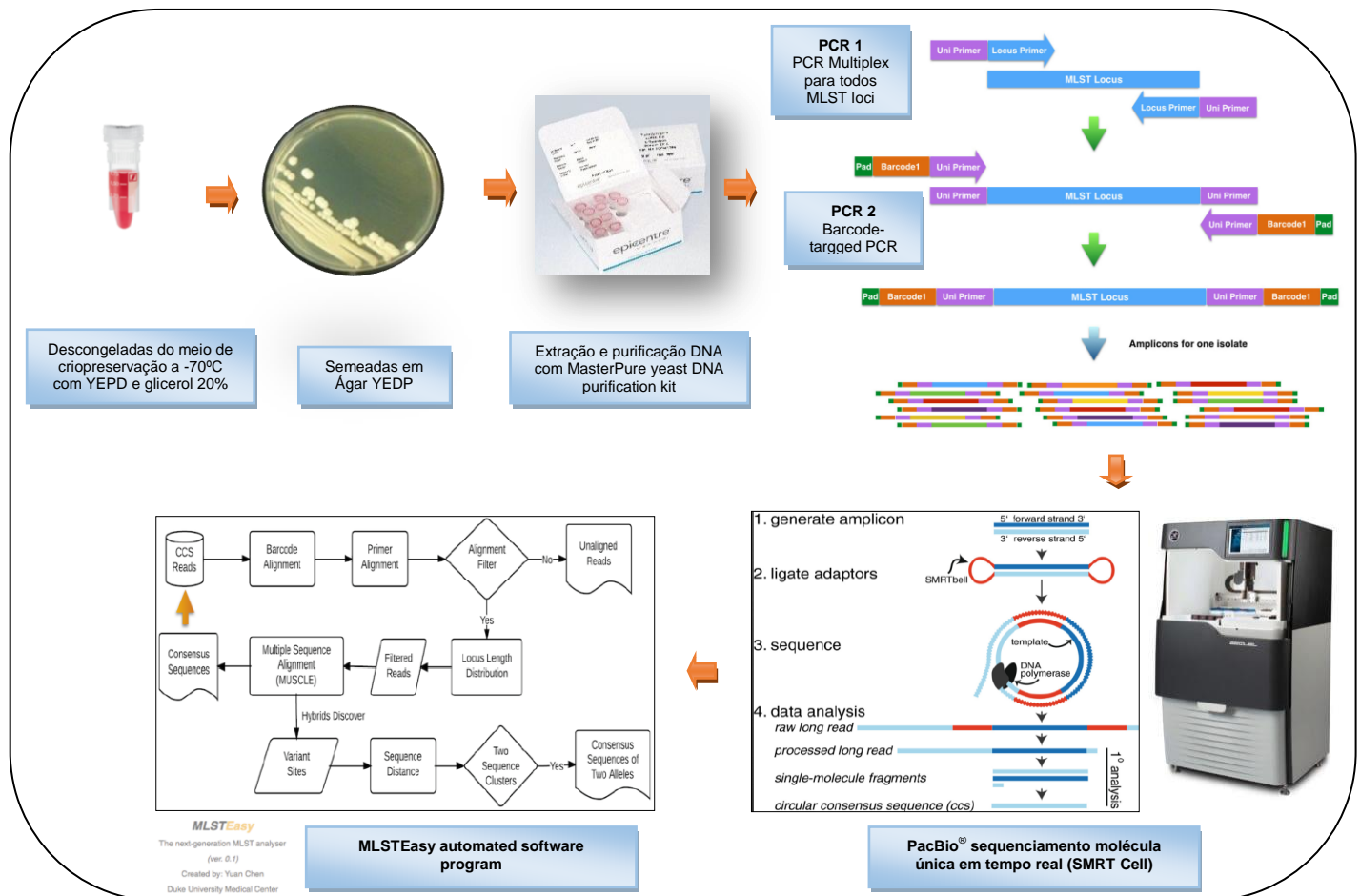
A segunda etapa teve como objetivo a caracterização genotípica das espécies dos complexos *C. neoformans*/*C.gattii* isolados de pacientes submetidos a transplante renal com ênfase em seu impacto na história natural da doença, perfil de susceptibilidade a antifúngicos e mortalidade. Nessa etapa só foram incluídos pacientes com cultura positiva, sendo o levantamento e a ficha clínica utilizada semelhante ao da etapa 1.

A primeira fase da etapa 2 foi realizada no Brasil, no Laboratório Especial de Micologia da UNIFESP, sob supervisão do Prof. Arnaldo Lopes Colombo e consistiu na identificação fenotípica dos isolados através de métodos convencionais. A segunda fase foi realizada no Perfect Laboratory da Duke University School of Medicine, sob supervisão do Prof. John R. Perfect. Os métodos laboratoriais utilizados nessa fase estão resumidos nas **Figuras 3 e 4**.



Legenda: CGB: canavanina-glicina-azul de bromotimol; YEPD, “yeast extract peptone dextrose”.

**Figura 3 - Esquema dos métodos convencionais de identificação dos complexos *C. neoformans*/*C. gattii* utilizados na etapa 2 do estudo.**



Legenda: DNA, ácido desoxirribonucleico; MLST, tipagem sequencial multi-locus; PCR, reação de cadeia de polimerase; SMRT, molécula única em tempo real; YEPD, “yeast extract peptone dextrose”.

Fonte: Fichot e Norman (2013); Chen, et al. (2015).<sup>(315, 316)</sup>

**Figura 4. Esquema dos métodos para identificação genotípica por “Next Generation Multilocus Sequence Typing” (NGMLST) dos complexos *C. neoformans*/*C. gattii* utilizados na etapa 2 do estudo.**

O presente estudo foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP com o número CEUA 318847 e os pacientes foram dispensados da assinatura de termo de consentimento, como o compromisso de manutenção do anonimato dos sujeitos da pesquisa (**Apêndice 2**).

### **3. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

---

### 3.1. Artigo Científico 1

#### **“Outcomes of cryptococcosis in renal transplant recipients in a less-resourced health care system”**

Publicado em agosto de 2018, no periódico “Transplant Infectious Disease”, volume 20, número 4, páginas e12910. Os resultados parciais desse estudo também foram apresentados na forma de apresentação oral no 15º Congresso Brasileiro de Infectologia, realizado no período de 20 de outubro a 23 de outubro de 2007, na cidade de Curitiba, PR, Brasil.

Received: 21 December 2017 | Revised: 11 March 2018 | Accepted: 20 March 2018

DOI: 10.1111/tid.12910

## ORIGINAL ARTICLE

WILEY

# Outcomes of cryptococcosis in renal transplant recipients in a less-resourced health care system

Vinicius Ponzio<sup>1</sup>  | Luis Fernando Camargo<sup>1</sup> | José Medina-Pestana<sup>2</sup> | John Robert Perfect<sup>3</sup> | Arnaldo Lopes Colombo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Discipline of Nephrology, Hospital do Rim Oswaldo Ramos Foundation, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Duke University School of Medicine, Durham, NC, USA

## Correspondence

Arnaldo Lopes Colombo, UNIFESP, São Paulo, Brazil.  
Email: colomboal@terra.com.br

## Funding information

Ponzio V. was supported by National Council of Technological and Scientific Development scholarship (CNPq 132513/2005-6). Perfect J.R. was supported by Public Health Service Grants AI73896, AI04533 and AI93257. Colombo A.L. was supported by National Council of Technological and Scientific Development (CNPq 307510/2015-8).

## Abstract

**Background:** Cryptococcosis is the second most common cause of invasive fungal infections in renal transplant recipients in many countries, and data on graft outcome after treatment for this infection is lacking in less-resourced health care settings.

**Methods:** Data from 47 renal transplant recipients were retrospectively collected at a single institution during a period of 13 years. Graft dysfunction, graft loss, and mortality rates were evaluated. Predictors of mortality and graft loss were estimated.

**Results:** A total of 38 (97.4%) patients treated with amphotericin B deoxycholate (AMBd) showed graft dysfunction after antifungal initiation and 8 (18.2%) had kidney graft loss. Graft loss within 30 days after cryptococcosis onset was significantly associated with disseminated infection, greater baseline creatinine levels, and graft dysfunction concomitant to AMBd therapy and an additional nephrotoxic condition. The 30-day mortality rate was 19.2% and it was significantly associated with disseminated and pulmonary infections, somnolence at admission, high CSF opening pressure, positive CSF India ink, creatinine levels greater than 2.0 mg/dL at admission, graft dysfunction in patients treated with AMBd and an additional nephrotoxic condition and graft loss within 30 days.

**Conclusion:** Graft dysfunction was common in renal transplant recipients with cryptococcosis treated with AMBd. The rate of graft loss rate was high, most frequently in patients with concomitant nephrotoxic conditions. Therefore, the clinical focus should be on the use of less nephrotoxic lipid formulations of amphotericin B in this specific population requiring a polyene induction regimen for treatment of severe cryptococcosis in all health care systems caring for transplantation recipients.

## KEYWORDS

amphotericin B, cryptococcosis, less-resourced health care system, renal dysfunction, renal transplantation

## 1 | INTRODUCTION

Cryptococcosis is a life-threatening invasive fungal disease caused by an encapsulated yeast, *Cryptococcus* spp. complex, predominantly

represented by *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*.<sup>1</sup> Although the majority of infections occur by inhalation of infectious propagules from the environment,<sup>2</sup> the disease can be directly acquired from an infected transplanted organ.<sup>3-5</sup> *C. neoformans* has a worldwide distribution with sporadic occurrences of infection, particularly among patients with impaired cell-mediated immunity, including transplant recipients.<sup>2,6,7</sup>

During the 1980s and 1990s, cryptococcosis was considered a major fungal infection among patients with acquired immune

**Abbreviations:** AIDS, Acquired Immune Deficiency Syndrome; AMBd, Amphotericin B deoxycholate; CNS, Central Nervous System; CSF, Cerebrospinal Fluid; IRIS, Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome; SD, Standard Deviation; SOT, Solid Organ Transplant.



deficiency syndrome (AIDS).<sup>2,8</sup> After the advent of highly active antiretroviral therapy, the burden of all opportunistic infections related to AIDS patients, including cryptococcosis, decreased substantially.<sup>9-13</sup> On the other hand, solid organ transplant recipients persistently continue to be a major "at risk" population for cryptococcosis. For example, current experience indicates that 18%-65% of all cryptococcal diseases reported among HIV-negative patients occur in organ transplant recipients<sup>7,14,15</sup> and with an increasing worldwide transplant population, it is likely that cryptococcosis will continue to increase.

Cryptococcosis is specifically recognized as the second most common invasive fungal infection in renal transplant recipients in many countries, including Brazil,<sup>16,17</sup> with incidence rates ranging from 0.3% to 5.5% and overall mortality rates as high as 20%-50% have been reported.<sup>18-23</sup> Amphotericin B formulations are considered the best option for primary therapy and the 2010 IDSA Guidelines recommend lipid formulations of amphotericin B.<sup>24-27</sup> However, amphotericin B deoxycholate (AMBd) has been extensively used to treat cryptococcosis after renal transplantation in some cases related to acquisition costs<sup>21,24,27-29</sup> despite the fact that these patients face a high risk of nephrotoxicity and are frequently exposed to other nephrotoxic drugs such as calcineurin inhibitors.

Although AMBd-related nephrotoxicity in renal transplant recipients is expected, data regarding the impact of this therapeutic strategy are scarce in the medical literature in resource-limited medical communities.<sup>29-32</sup> The North-American Guidelines for cryptococcosis suggest the use of lipid formulations of amphotericin B associated with flucytosine for induction therapy of central nervous system (CNS) and disseminated disease in solid organ transplant (SOT).<sup>25</sup> However, in most resource-limited countries, these 2 treatment options are either not available or too expensive. The purpose of this study was therefore to assess renal allograft dysfunction and its impact on renal transplant recipients with cryptococcosis receiving antifungal therapy in a single institution with standardized medical care system and without use of flucytosine and lipid formulations of amphotericin B.

## 2 | PATIENTS AND METHODS

### 2.1 | Patients

The study consisted of a retrospective medical record review of all patients who developed cryptococcosis after renal transplantation at the Federal University of São Paulo, Brazil, during a period of 13 years. Cases were identified by checking multiple sources: clinical forms completed by Infectious Diseases consults, the International Classification of Disease—Tenth Revision codes from charts, mycological laboratory and histopathology records, and cryptococcal antigen test results.

### 2.2 | Definitions

An incident case was defined as a patient who developed cryptococcosis after renal transplantation based on the following diagnostic

criteria<sup>33,34</sup>: (i) *Cryptococcus neoformans* or *C. gattii*-positive culture obtained from any site; or (ii) a significant cryptococcal antigen titer ( $\geq 1:8$ ) in cerebrospinal fluid (CSF) or serum specimens with a compatible clinical and/or radiographic presentation; or (iii) biopsy specimens exhibiting encapsulated "yeast-like" forms consistent with *Cryptococcus* spp. The involved sites were classified as: (i) CNS; (ii) pulmonary; and (iii) skin, soft-tissue and/or osteoarticular.<sup>22</sup> Disseminated cryptococcosis was defined as the involvement of at least 1 non-contiguous organ systems or the presence of fungemia.<sup>20</sup> Primary therapy was defined as the first systemic antifungal regimen administered for at least 2 consecutive days.<sup>14</sup> "Additional nephrotoxic conditions" were defined as any other reason for nephrotoxicity such as pyelonephritis, other administered nephrotoxic drug, rejection of transplanted organ, or acute tubular necrosis secondary to sepsis. However, usage of calcineurin inhibitors was not included as one of the nephrotoxic conditions for this analysis.

### 2.3 | Graft dysfunction

Renal allograft baseline outcomes were examined by analyzing the serum creatinine level at the time of the diagnosis of the cryptococcosis, first day of antifungal therapy, peak value during antifungal therapy and 15 days, 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, 36, and 48 months after the diagnosis of cryptococcal infection. Graft dysfunction was evaluated by comparing the serum creatinine level at the time of the cryptococcosis diagnosis (baseline creatinine) with the peak creatinine value observed during antifungal therapy and follow-up. Peak creatinine levels were defined as the maximum creatinine value during the study evaluation period. The intensity of dysfunction was also classified using 3 categories: (i) mild—the serum creatinine value increased up to 25% from baseline to peak; (ii) moderate—the increase was 26-50% from baseline to peak; and (iii) severe—the increase was greater than 50%. Graft loss was defined as the need for dialysis with or without graft removal.

### 2.4 | Mortality

The mortality rate was assessed at 30 and 90 days after the diagnosis of cryptococcosis and risk factors associated with this acute mortality were analyzed.

### 2.5 | Data collection

Epidemiological and clinical data in all cases of cryptococcal infection were collected from the medical records using a standard clinical report form. Variables assessed included demographic data, prior and concomitant infections, episodes of graft rejection, detailed transplant descriptions, immunosuppressive regimens and relevant laboratory data. In addition, we collected all data related to the antifungal therapeutic regimens employed, including the duration of therapy, total doses of AMBd, and concomitant use of other nephrotoxic agents.

## 2.6 | Statistical analysis

Continuous data were presented as either the mean  $\pm$  SD or the median and range, and categorical data were presented as proportions. Univariate analyses were performed to compare categorical variables between the patients with and without graft loss using either the Chi-square or Fisher's exact test, as appropriate. The one-way ANOVA method was used to test differences between means. The same analyses were used to evaluate factors associated with mortality. Graft survival rates were estimated using Kaplan-Meier methods, and comparisons between groups were performed using log-rank tests. All analyses were performed using SPSS software for Windows, version 11.5 (SPSS, Chicago, IL). A value of  $P \leq .05$  was considered statistically significant.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Baseline and clinical characteristics

During the 13-year study period, a total of 47 cases of cryptococcosis were identified among 5623 renal transplant recipients, representing an incidence rate of 8.4 per 1000 renal transplants in this health care system. The median follow-up period after cryptococcal diagnosis was a robust 18.8 months, ranging from 0 days to 11 years. Of note, 36% of the patients died within 6 months after diagnosis of cryptococcosis and the follow-up was not available for 5 patients. As indicated in Table 1, 32 of 47 (68.1%) patients were male, and the mean ( $\pm$ SD) age was  $41 \pm 11.28$  years (range 20-67). Among these 47 patients, 31(66%) were living-related donor recipients. This finding is consistent with the profile of donor types observed in our institution during the study period. Acute rejection episodes preceding fungal disease were documented in 18 (38.3%) patients, ranging from 37 days to 199 months before the onset of cryptococcal infection (average of 35 months). Patients with organ rejections were treated with high-dose steroid therapy (17 patients) and/or an antibody preparation (2 patients muromonab-CD3 and 2 thymoglobulin). Other baseline characteristics are outlined in Table 1.

Cryptococcosis occurred  $>1$  year after transplant in 76.6% of patients (median time of 42 months). Regarding the site of infection, CNS involvement occurred in 74.5% (35/47) of cases, pulmonary or cutaneous involvement occurred in 34% (16/47) each, and a disseminated infection was observed in 42.6% (20/47) (Table 1). Regarding pulmonary involvement, 7 of 16 (43.7%) had evidence of respiratory insufficiency and in 8 cases, the pulmonary radiographs were multifocal in character, with 2 cases presenting as pleural effusions. Forty-five recipients received antifungal treatment, and the other 2 patients died before diagnosis. Primary therapy included AMBd in 41 of 47 (87.2%) patients and fluconazole alone in 4 (8.5%) patients as induction therapy, with a duration of therapy ranging from 2 to 219 days and a median of 16 days. No patient received concomitant flucytosine treatment. The mean dose of AMBd therapy was 0.7 mg/kg/day (SD  $\pm$  0.15). The patients initially treated with AMBd had their therapy switched to fluconazole as soon as they were

**TABLE 1** Demographic and clinical characteristics of the 47 study patients

Characteristics	Value, % (No. of patients) (n = 47)
Mean age $\pm$ SD (range), years	$41 \pm 11.28$ (20-67)
Male	68.1 (32)
Retransplant <sup>a</sup>	6.4 (3)
Donor type	
Deceased	34 (16)
Living	66 (31)
Immunosuppressive agent received <sup>b</sup>	
Prednisone	100 (47)
Mycophenolic acid <sup>c</sup>	44.7 (21)
Cyclosporine A	38.3 (18)
Azathioprine	34 (16)
Tacrolimus	31.9 (15)
Rapamycin	6.4 (3)
Prior rejection	38.3 (18)
Diabetes mellitus	23.4 (11)
Cytomegalovirus infection	23.4 (11)
Time to onset of infection after transplant, average months (range)	42 (20 d-17 y)
Sites of involvement	
CNS	74.5 (35)
Pulmonary	34 (16)
Skin, soft-tissue, or osteoarticular	34 (16)
Disseminated infection <sup>d</sup>	42.6 (20)
Antifungal therapy	
Amphotericin B	87.2 (41)
Fluconazole	8.5 (4)
None	4.3 (2)

CNS, central nervous system; SD, standard deviation.

<sup>a</sup>Indicates prior receipt of a renal transplant.

<sup>b</sup>Immunosuppressive agent that remained unchanged within 3 mo of the onset of cryptococcosis.

<sup>c</sup>Includes mycophenolate mofetil or mycophenolate sodium.

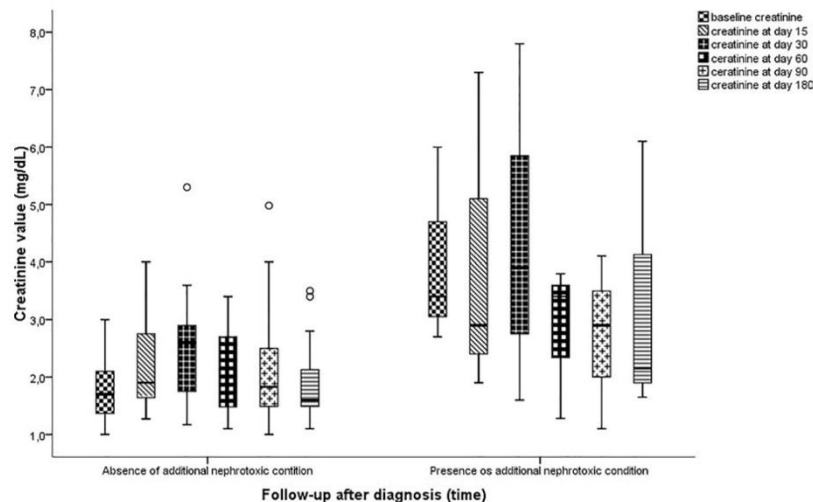
<sup>d</sup>Defined as the involvement of at least two noncontiguous organ systems or the presence of fungemia.

clinically stable as judged individually by caregivers. The mean total duration of therapy was 124.03 days (SD  $\pm$  105.11), ranging from 1 to 415 days.

### 3.2 | Allograft dysfunction

Creatinine values were available for 44 of 47 patients because 2 patients died before diagnosis and creatinine levels were missing for 1 patient who received fluconazole. The mean baseline serum creatinine value was  $2.6 \pm 1.66$  mg/dL (range 0.6-7.6 mg/dL), and the mean peak creatinine level was  $3.9 \pm 2.17$  mg/dL (range, 1.0-10.8 mg/





**FIGURE 1** Temporal trend of serum creatinine levels in patients treated with amphotericin B according to the presence ( $n = 8$ ) or absence of additional nephrotoxic conditions ( $n = 31$ )

dL). Of these 44 patients, 42 (95.5%) showed an increase in serum creatinine levels after starting antifungal therapy. All but 3 of the patients who had allograft dysfunction were treated with AMBd; the remaining patients were treated with fluconazole. With regard to dysfunction intensity in patients treated with AMBd, 46.2% (18/39) of cases met the criteria for severe dysfunction, 28.2% (11/39) had moderate graft dysfunction, and 25.6% (10/39) had mild graft dysfunction. Indeed, in 31 of the 39 (79.5%) patients who developed graft dysfunction, AMBd was the only nephrotoxic condition detected, except the use of calcineurin inhibitors in 20 patients. The 8 remaining patients who were treated with AMBd and developed graft dysfunction had simultaneous nephrotoxic conditions before antifungal therapy and are described as follows: 3 cases of acute episodes of renal rejection, 2 cases of pyelonephritis, 2 cases of sepsis and 1 case of acute tubular necrosis. The creatinine value pattern between the patients for whom AMBd was the sole nephrotoxic condition and the patients who had another condition associated with AMBd is outlined in Figure 1.

The allograft was lost during the course of antifungal therapy in 8 of 44 (18.2%) renal transplant recipients, and all but one of these 8 patients had received AMBd. Furthermore, 25% of the deceased-related donor recipients had allograft loss compared to 11.1% of the living-related donor recipients. Renal graft loss occurred between 1 and 39 days after starting antifungal therapy. Among the 7 patients who were treated with AMBd and lost their grafts, 4 patients had another nephrotoxic condition associated with AMBd therapy.

Univariate analysis consistently demonstrated that graft loss within 30 days after cryptococcosis was significantly associated with disseminated infections, greater baseline serum creatinine levels and graft dysfunction after AMBd treatment in the presence of additional nephrotoxic conditions (Table 2). Graft survival analysis shows that the probability of graft survival after the diagnosis of cryptococcosis was significantly lower in patients treated with AMBd who had graft dysfunction in the presence of an additional nephrotoxic condition than in those without such a condition ( $P = .02$ , log rank test) (Figure 2). Of note, the amphotericin B duration and the

modification of the immunosuppressive regimen, including suspension of a calcineurin inhibitor, were similar in both groups (Table 2). A multivariable analysis was not able to identify any independent risk factors associated with graft loss, and this finding was probably because of the limited number of patients.

We were not able to identify any correlation between a specific immunosuppressive regimen used in combination with amphotericin B and graft dysfunction. Indeed, graft dysfunction was even reported with patients receiving amphotericin B and rapamycin (a non-nephrotoxic immunosuppressive) at the time cryptococcosis was diagnosed. Finally, during the period of this study, only 3 patients (6.4%) met our criteria for immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS). The IRIS occurred after the graft dysfunction, and by timing did not appear to be associated with the allograft loss.

### 3.3 | Predictors of death

In our study, 9 of the 47 (19.2%) patients died within 30 days of being diagnosed with cryptococcosis, and 13 of 45 (28.9%) patients died within 90 days of diagnosis. The overall mortality rate in the study group was 48.9% (23/47). Based on the univariate analysis, the following factors were significantly ( $P < .05$ ) associated with high mortality at 30 days: disseminated and pulmonary infection, creatinine levels greater than 2.0 mg/dL at admission, somnolence at admission, high CSF opening pressure, positive CSF India ink, graft dysfunction in patients treated with AMBd with additional nephrotoxic conditions and graft loss within 30 days (Table 3).

## 4 | DISCUSSION

This study demonstrates important aspects of cryptococcosis in renal transplant recipients, treated with AMBd in a single public kidney transplant center in Brazil. Over the course of 13 years, 0.8% of renal transplant recipients developed cryptococcosis, and most

**TABLE 2** Analysis of the variables associated with kidney graft loss within 30 d after cryptococcosis

Variables (n°. patients) n = 39	No Graft Loss, % n = 33	Graft Loss, % n = 6	P value
Age > 50 y, years <sup>13</sup>	27.3	66.7	.082
Male (25)	63.6	66.7	.635
Retransplant <sup>a</sup> 3	6.1	16.7	.403
Donor type			
Deceased <sup>12</sup>	27.3	50	.257
Living <sup>27</sup>	72.7	50	
Cytomegalovirus infection <sup>b</sup> 4	6.1	33.3	.104
Prior rejection <sup>15</sup>	39.4	33.3	.579
Diabetes mellitus <sup>8</sup>	21.2	16.7	.642
Baseline creatinine, mean, $\pm$ SD, mg/dL <sup>36</sup>	2.3 $\pm$ 1.31	5.1 $\pm$ 1.89	.0001
Sites of involvement			
CNS <sup>27</sup>	69.7	66.7	.612
Pulmonary <sup>12</sup>	24.2	66.7	.06
Skin, soft-tissue, or osteoarticular <sup>14</sup>	33.3	50	.365
Disseminated infection <sup>15</sup>	30.3	83.3	.024
AMBd as primary therapy <sup>35</sup>	90.9	83.8	.502
Duration of AMBd therapy, mean $\pm$ SD, days <sup>35</sup>	25.1 $\pm$ 23.16	21.6 $\pm$ 34.4	.858
Dose of AMBd, mean, $\pm$ SD, mg/Kg <sup>32</sup>	0.7 $\pm$ 0.15	0.7 $\pm$ 0.12	.281
Change in immunosuppressive regimen after infection <sup>28d</sup>	78.1	60	.352
Presence of additional nephrotoxic condition <sup>6ce</sup>	7.1	80	.0001

AMBd, amphotericin B deoxycholate; CNS, central nervous system; SD, standard deviation.

<sup>a</sup>Indicates prior receipt of a renal transplant.

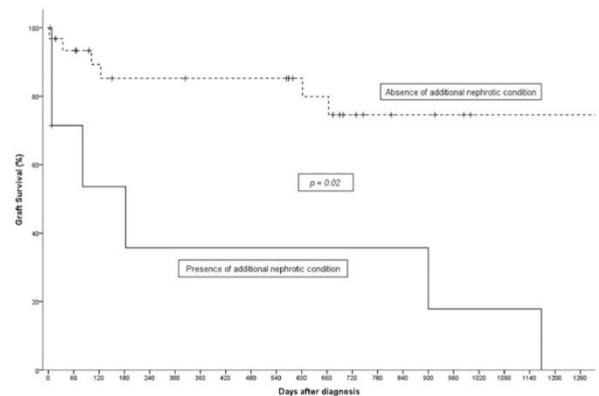
<sup>b</sup>Infection occurring within 6 mo of the onset of cryptococcosis.

<sup>c</sup>Patients treated with AMBd who developed graft dysfunction and had an additional nephrotoxic condition.

<sup>d</sup>Data were available for 37 patients.

<sup>e</sup>Data were available for 33 patients.

occurred a long time after transplantation. The incidence of cryptococcosis in renal transplant recipients observed in this study was similar to the low incidence rates reported by other groups (0.3%-5.5%),<sup>16,18,20-23,32,35-39</sup> but with high mortality.<sup>23</sup> Among these 47 patients, the majority had received AMBd (87.2%) as first-line therapy. Unfortunately, flucytosine or lipid formulation of amphotericin B were not available or used during the study period, respectively.

**FIGURE 2** Kaplan-Meier graft survival analysis in patients treated with AMBd and who had allograft dysfunction according to the presence (n = 8) or absence of additional nephrotoxic conditions (n = 31)

Data on the antifungal treatment of cryptococcosis in SOT recipients are still scarce, particularly in Latin American countries but the transplant recipient populations are enlarging in these less-resourced areas. Considering that SOT represents only 5%-10% of all patients enrolled in clinical trials of cryptococcosis, recommendations for antifungal therapy in this particular population are extrapolated from data generated from studies of other high-risk populations, retrospective cohorts from many different medical centers in resource-available health care systems and expert opinions.<sup>25,40,41</sup> In our study, almost all of the patients received AMBd as a primary therapy, which is in accordance with a multicenter study published by Singh et al, in which 67.5% of the cases were initially treated with a AmBd.<sup>24</sup> Despite the notable AMBd-related nephrotoxicity and its consequences in terms of the length of hospital stay, total cost of health care and mortality rates, AMBd remains a cornerstone in the treatment of cryptococcosis worldwide primarily because of the high acquisition costs for lipid formulations of amphotericin B.<sup>42-44</sup>

The clinical impact of AMBd-nephrotoxicity appears to be amplified in patients exposed to other nephrotoxic conditions and in patients with preexisting renal dysfunctions before the initiation of AMBd treatment.<sup>45-47</sup> In this study, 95.5% of the cases developed renal graft dysfunction after beginning antifungal therapy for cryptococcosis. Furthermore, severe dysfunction was observed in 46.2% of these patients, and a substantial percentage (18.2%) of the patients in this study progressed to graft loss after the infection. For context, data recently provided by our institution describing a cohort of 10 400 kidney transplants reported 12.7% graft loss in deceased-related donor recipients after 1 year of transplant and 6.5% in living-related donor recipients within 1 year of transplant.<sup>48</sup>

Although AMBd-related nephrotoxicity in renal transplant recipients is a crucial issue, it has been critically addressed in the medical literature.<sup>31,32</sup> Conti et al showed that almost all renal transplant recipients (10 of 11) had graft loss after treatment with AMBd.<sup>31</sup> Also, in a retrospective study conducted by Wingard et al,<sup>43</sup> 15 of 42 (36%) solid organ transplant recipients with aspergillosis presented



**TABLE 3** Analysis of variables associated with mortality 30 d after cryptococcosis in study patients

Variables (n° patients) n = 47	Survival, % n = 38	Death, % n = 9	P value
Age, mean, $\pm$ SD, years <sup>47</sup>	451 $\pm$ 1107	497 $\pm$ 10.50	.271
Male <sup>32</sup>	68.4	66.7	.604
Retransplant <sup>a 3</sup>	7.9	0	.520
Prior rejection <sup>18</sup>	36.8	44.4	.476
Cytomegalovirus infection <sup>b 4</sup>	7.9	11.1	.586
Receipt of a calcineurin-inhibitor agent <sup>c 32</sup>	68.4	66.7	.604
Duration of symptoms before diagnosis, mean, $\pm$ SD <sup>42</sup>	44.4 $\pm$ 48.83	58.8 $\pm$ 125.09	.598
Time to diagnose after admission, mean, $\pm$ SD <sup>42</sup>	5.8 $\pm$ 9.18	8.4 $\pm$ 12.11	.514
Sites of involvement <sup>47</sup>			
CNS <sup>35</sup>	68.4	100	.052
Pulmonary <sup>16</sup>	26.3	66.7	.031
Skin, soft-tissue, or osteoarticular <sup>16</sup>	34.3	33.3	.641
Disseminated infection <sup>21</sup>	31.6	88.9	.003
Creatinine at admission >2 mg/dL <sup>d 27</sup>	52.8	88.9	.05
Somnolence at admission <sup>e 17</sup>	38.5	77.8	.049
Headache at admission <sup>e 23</sup>	69.2	55.6	.361
CSF opening pressure <sup>f</sup> , cmH <sub>2</sub> O <sup>23</sup>	24.8 $\pm$ 285.19	55.5 $\pm$ 32.71	.002
CSF cell count <sup>f</sup> , mean, $\pm$ SD, mm <sup>332</sup>	168.7 $\pm$ 285.19	87.3 $\pm$ 87.10	.467
CSF glucose ratio <sup>f</sup> , mean, $\pm$ SD, mg/dL <sup>32</sup>	47.2 $\pm$ 23.53	45.3 $\pm$ 21.98	.848
Positive CSF India ink <sup>g 11</sup>	24	71.4	.032
CSF antigen titer >1:1024 <sup>h 11</sup>	38.1	60	.346
AMBd as primary therapy <sup>41</sup>	89.5	100	.495
Unfavorable response with 2 wk <sup>i 21</sup>	52	88.9	.056
Change in immuno-suppressive regime after infection <sup>i 31</sup>	87.1	12.9	.296

(Continues)

**TABLE 3** (Continued)

Variables (n° patients) n = 47	Survival, % n = 38	Death, % n = 9	P value
Presence of additional nephrotoxic condition <sup>j 8</sup>	11.8	57.1	.018
Graft loss within 30 d <sup>k 6</sup>	8.3	100	.002

AMBd, amphotericin B deoxycholate; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; SD, standard deviation.

<sup>a</sup>Indicates prior receipt of a renal transplant.

<sup>b</sup>Infection occurring within 6 mo of the onset of cryptococcosis.

<sup>c</sup>At cryptococcosis diagnosis.

<sup>d</sup>Data were available for 45 patients.

<sup>e</sup>Data were available for 35 patients.

<sup>f</sup>In the first CSF.

<sup>g</sup>Data were available for 32 patients.

<sup>h</sup>Data were available for 27 patients.

<sup>i</sup>Data were available for 34 patients.

<sup>j</sup>Data were available for 41 patients. Patients treated with AMBd who developed graft dysfunction and had an additional nephrotoxic condition.

<sup>k</sup>Data were available for 39 patients.

with serum creatinine levels higher than 2.5 mg/dL after starting AMBd, and 18% of these patients required hemodialysis but solid organ transplant recipients were less likely to die compared with bone marrow transplant patients. To limit graft damage by AMBd, some authors have suggested treating cryptococcosis with low doses of AMBd or repeated withdrawal of the antifungal drug when facing renal dysfunction.<sup>29,30</sup> Of note, both strategies may negatively influence the patient outcome and the length of hospital stay.<sup>49</sup> Switching from AMBd to a less nephrotoxic antifungal agent after facing renal dysfunction may be a delayed strategy in the light of findings reported by Klibanov et al. They found that only 5 of 25 patients who received AMBd and developed nephrotoxicity showed any improvement of their ongoing renal impairment after switching to an antifungal agent with less renal toxicity.<sup>50</sup>

Our data consistently showed that AMBd-treated cryptococcosis is associated with a high frequency of renal dysfunction and graft loss. In fact, graft loss was higher in patients exposed to AMBd with other nephrotoxic conditions. A recent study reviewed the literature of all cases of cryptococcosis in SOT recipients available in the PubMed database and found a significantly lower mortality rate among patients receiving lipid formulations of amphotericin B compared with those receiving AMBd and a higher mortality rate among patients with renal failure at baseline.<sup>51</sup> In another study of SOT recipients, patients treated with lipid formulations of amphotericin B had improved survival when compared with AMBd, even after controlling for factors such as renal failure at baseline and fungemia. In this study the lipid formulation of amphotericin B-treated group mortality was 10.9% compared to 40% in the AMBd-treated group.<sup>26</sup> As noted in our study 90 day mortality reached almost 30%, it is likely that reduced nephrotoxicity in our patients could translate

into a substantial mortality benefit. For mild-to-moderate non-CNS disease, fluconazole is recommended as primary therapy, avoiding AMBd nephrotoxicity.<sup>24,25</sup> Consequently, it is reasonable to advocate that AMBd should be avoided in this particular setting when the patients have higher baseline creatinine levels and concomitant exposure to other nephrotoxic conditions. These data lend support to recent recommendations from experts suggesting the use of lipid formulations of amphotericin B as the primary therapy in patients with cryptococcal meningoencephalitis, owing to the fact that many transplant recipients receive calcineurin inhibitors that also possess renal dysfunction capabilities.<sup>52,53</sup> However, it is difficult to attribute allograft dysfunction exclusively to AMBd use because it is important to note that our population also had many other putative nephrotoxic conditions, such as acute episodes of renal rejection, pyelonephritis, sepsis, acute tubular necrosis and the use of calcineurin inhibitors.

Dissemination of infection was correlated to graft loss in our study but just 3 patients had renal cryptococcosis as demonstrated by graft biopsy and yeast invasion of the kidney is not likely to explain this correlation. On the other hand, the baseline creatinine value of patients with dissemination of the infection was much higher than patients without dissemination, and this finding might explain the result. Previous studies have described allograft loss and IRIS related to the discontinuation of calcineurin inhibitor.<sup>54,55</sup> However, IRIS and its management did not correlate with graft loss in this study.

Infection is still the main cause of death in our institution and cryptococcosis is a prevalent, life-threatening mycoses in renal transplant recipients, and mortality rates have ranged from 31% to 76%.<sup>20-22,30,32,36,39,48</sup> The significant predictors for death in SOT recipients are based on organ dysfunction and the severity of the disease, such as a high serum creatinine value at admission, disseminated infection and liver failure.<sup>21,22,56,57</sup> These findings are supported by this study, in which disseminated infection and creatinine levels upon admission higher than 2 mg/dl were direct predictors of mortality. Finally, somnolence at admission, baseline positive CSF India ink, graft loss within 30 days and the presence of another nephrotoxic condition in patients treated with AMBd and with graft dysfunction were also found as predictors of mortality in our study. Probably, pulmonary involvement was a predictor of death because of the severe lung disease described secondary to late diagnosis (median of 102 days of pulmonary symptoms before diagnosis).

This study has certain limitations, including the fact that it is a retrospective study dealing with small numbers of patients. Another relevant limitation is the use of serum creatinine values to estimate renal function in transplantation, because a variety of conditions and drugs can also affect creatinine levels. Nevertheless, this study represents the largest series ever published by a single medical center of renal transplant recipients in which patients could be evaluated by the same team in accordance with the same management criteria.

In summary, this study details allograft renal dysfunction after cryptococcosis in kidney transplant recipients. We found that graft dysfunction is common in patients treated for cryptococcosis and

can drastically influence graft survival in this setting, especially in patients with conditions that clearly increase the risk of nephrotoxicity. It is extremely important in resource-limited health care systems that for this infection (meningitis/disseminated disease) every effort is made to use lipid formulations of amphotericin B for induction therapy or even consider the combination of flucytosine or fluconazole and make an effort to avoid AMBd. Finally, flucytosine should also be available for optimal combination induction therapy in health care systems that care for renal transplant recipients. In less-resourced health care systems the exceptions for successful management of cryptococcosis can be similar to resource-available systems and outcomes could be significantly improved by protecting renal functions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the clinical staff of the hospitals involved and the staff at the clinical mycological laboratory of the Federal University of São Paulo for performing the cryptococcal antigen tests and identifying the study isolates.

## CONFLICTS OF INTEREST

Ponzio V. received a educational grants from Pfizer, Gilead Sciences-United Medical (Brazil), Merck Sharp and Dohme, Astellas, TEVA, and Sanofi. Authors Camargo L. F. and Medina-Pestana J. report no conflicts of interest. Perfect J. R. received a grants, consultant fees, and Honorariums from Astellas, Pfizer, Merck, TEVA, F-2G, Matinas, Viamet, Amplyx, Vical, and Cidara. Colombo A. L. received a educational grants from Pfizer, Gilead Sciences-United Medical (Brazil), Merck Sharp and Dohme, and a research grant from Astellas and Pfizer.

## AUTHORS CONTRIBUTIONS

Ponzio V., Camargo L. F., and Colombo A. L. involved in design, data analysis, and drafting article; Medina-Pestana J involved in critical revision and approval of article; Perfect J. R. involved in Critical revision of article.

## ORCID

Vinicius Ponzio  <http://orcid.org/0000-0003-2991-3084>

## REFERENCES

1. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, et al. The case for adopting the "Species Complex" nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *mSphere*. 2017;2:e00357-16.
2. Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30:179-206.
3. Ooi BS, Chen BT, Lim CH, Khoo OT, Chan DT. Survival of a patient transplanted with a kidney infected with *Cryptococcus neoformans*. *Transplantation*. 1971;11:428-429.



4. Beyt BE Jr. Diagnosis of cryptococcal endophthalmitis. *Am J Clin Pathol.* 1984;81:272.
5. Kanj SS, Welty-Wolf K, Madden J, et al. Fungal infections in lung and heart-lung transplant recipients. Report of 9 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1996;75:142-156.
6. Hajjeh RA, Conn LA, Stephens DS, et al. Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons. Cryptococcal Active Surveillance Group. *J Infect Dis.* 1999;179:449-454.
7. Pappas PG, Perfect JR, Cloud GA, et al. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clin Infect Dis.* 2001;33:690-699.
8. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS—100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:515-548.
9. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998;338:853-860.
10. Hung CC, Chang SC. Impact of highly active antiretroviral therapy on incidence and management of human immunodeficiency virus-related opportunistic infections. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:849-853.
11. Mirza SA, Phelan M, Rimland D, et al. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clin Infect Dis.* 2003;36:789-794.
12. Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Fontanet A, Ronin O, Dupont B, Lortholary O. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. *AIDS.* 2004;18:555-562.
13. Friedman GD, Jeffrey Fessel W, Udaltsova NV, Hurley LB. Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. *Mycoses.* 2005;48:122-125.
14. Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Launay O, Lortholary O. Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/D study. *PLoS Med.* 2007;4:e21.
15. Bratton EW, El Hussein N, Chastain CA, et al. Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. *PLoS ONE.* 2012;7:e43582.
16. Moysés Neto M, Muglia V, Batista MEPN, et al. Infecção por fungos e transplante renal: análise nos primeiros 500 pacientes transplantados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. *J Bras Nefrol.* 1995;17:162-170.
17. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis.* 2010;50:1101-1111.
18. Gallis HA, Berman RA, Cate TR, Hamilton JD, Gunnells JC, Stickel DL. Fungal infection following renal transplantation. *Arch Intern Med.* 1975;135:1163-1172.
19. Vilchez RA, Irish W, Lacomis J, Costello P, Fung J, Kusne S. The clinical epidemiology of pulmonary cryptococcosis in non-AIDS patients at a tertiary care medical center. *Medicine (Baltimore).* 2001;80:308-312.
20. Vilchez R, Shapiro R, McCurry K, et al. Longitudinal study of cryptococcosis in adult solid-organ transplant recipients. *Transpl Int.* 2003;16:336-340.
21. Wu G, Vilchez RA, Eidelman B, Fung J, Kormos R, Kusne S. Cryptococcal meningitis: an analysis among 5,521 consecutive organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2002;4:183-188.
22. Husain S, Wagener MM, Singh N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:375-381.
23. George IA, Santos CAQ, Olsen MA, Powderly WG. Epidemiology of cryptococcosis and cryptococcal meningitis in a large retrospective cohort of patients after solid organ transplantation. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4:ofx004.
24. Singh N, Lortholary O, Alexander BD, et al. Antifungal management practices and evolution of infection in organ transplant recipients with *Cryptococcus neoformans* infection. *Transplantation.* 2005;80:1033-1039.
25. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis.* 2010;50:291-322.
26. Sun HY, Alexander BD, Lortholary O, et al. Lipid formulations of amphotericin B significantly improve outcome in solid organ transplant recipients with central nervous system cryptococcosis. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1721-1728.
27. Moretti ML, Resende MR, Lazera MS, Colombo AL, Shikanai-Yasuda MA. [Guidelines in cryptococcosis-2008]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41:524-544.
28. Singh N, Husain S. Infections of the central nervous system in transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2000;2:101-111.
29. Stamm AM, Diasio RB, Dismukes WE, et al. Toxicity of amphotericin B plus flucytosine in 194 patients with cryptococcal meningitis. *Am J Med.* 1987;83:236-242.
30. Nobrega JP. Amphotericin B in the treatment of neurocryptococcosis in patients subjected to renal transplantation. *Arq Neuropsiquiatr.* 1988;46:117-126.
31. Conti DJ, Tolkoff-Rubin NE, Baker GP Jr, et al. Successful treatment of invasive fungal infection with fluconazole in organ transplant recipients. *Transplantation.* 1989;48:692-695.
32. Shaariah W, Morad Z, Suleiman AB. Cryptococcosis in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 1992;24:1898-1899.
33. Chen SC. Cryptococcosis in Australasia and the treatment of cryptococcal and other fungal infections with liposomal amphotericin B. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(Suppl 1):57-61.
34. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1813-1821.
35. Watson AJ, Russell RP, Cabreja RF, Braverman R, Whelton A. Cure of cryptococcal infection during continued immunosuppressive therapy. *Q J Med.* 1985;55:169-172.
36. Sampaio M, Ianhez LE, Sabbaga E. Protective effect of cyclosporine in human renal posttransplant cryptococcosis. *Transplant Proc.* 1992;24:3091.
37. Tharayil John G, Shankar V, Talaulikar G, et al. Epidemiology of systemic mycoses among renal-transplant recipients in India. *Transplantation.* 2003;75:1544-1551.
38. Kong NC, Shaariah W, Morad Z, Suleiman AB, Wong YH. Cryptococcosis in a renal unit. *Aust N Z J Med.* 1990;20:645-649.
39. John GT, Mathew M, Snehalatha E, et al. Cryptococcosis in renal allograft recipients. *Transplantation.* 1994;58:855-856.
40. Hamill RJ, Sobel JD, El-Sadr W, et al. Comparison of 2 doses of liposomal amphotericin B and conventional amphotericin B deoxycholate for treatment of AIDS-associated acute cryptococcal meningitis: a randomized, double-blind clinical trial of efficacy and safety. *Clin Infect Dis.* 2010;51:225-232.
41. Dismukes WE, Cloud G, Gallis HA, et al. Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. *N Engl J Med.* 1987;317:334-341.
42. Bates DW, Su L, Yu DT, et al. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clin Infect Dis.* 2001;32:686-693.

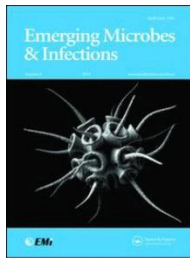
43. Wingard JR, Kubilis P, Lee L, et al. Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1999;29:1402-1407.
44. Ullmann AJ, Sanz MA, Tramarin A, et al. Prospective study of amphotericin B formulations in immunocompromised patients in 4 European countries. *Clin Infect Dis*. 2006;43:e29-e38.
45. Fisher MA, Talbot GH, Maislin G, McKeon BP, Tynan KP, Strom BL. Risk factors for Amphotericin B-associated nephrotoxicity. *Am J Med*. 1989;87:547-552.
46. Bates DW, Su L, Yu DT, et al. Correlates of acute renal failure in patients receiving parenteral amphotericin B. *Kidney Int*. 2001;60:1452-1459.
47. Berdichevski RH, Luis LB, Crestana L, Manfro RC. Amphotericin B-related nephrotoxicity in low-risk patients. *Braz J Infect Dis*. 2006;10:94-99.
48. de Castro Rodrigues Ferreira F, Cristelli MP, Paula MI, et al. Infectious complications as the leading cause of death after kidney transplantation: analysis of more than 10,000 transplants from a single center. *J Nephrol*. 2017;30:601-606.
49. Bratton EW, El Hussein N, Chastain CA, et al. Approaches to antifungal therapies and their effectiveness among patients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:2485-2495.
50. Klibanov OM, Raasch RH, Rublein JC. Changes in renal function after changes in antifungal drug therapy. *Am J Health Syst Pharm*. 2004;61:50-53.
51. Sun HY, Wagener MM, Singh N. Cryptococcosis in solid-organ, hematopoietic stem cell, and tissue transplant recipients: evidence-based evolving trends. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1566-1576.
52. Singh N, Dromer F, Perfect JR, Lortholary O. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients: current state of the science. *Clin Infect Dis*. 2008;47:1321-1327.
53. Singh N. How I treat cryptococcosis in organ transplant recipients. *Transplantation*. 2012;93:17-21.
54. Singh N, Lortholary O, Alexander BD, et al. Allograft loss in renal transplant recipients with cryptococcus neoformans associated immune reconstitution syndrome. *Transplantation*. 2005;80:1131-1133.
55. Sun HY, Alexander BD, Huprikar S, et al. Predictors of immune reconstitution syndrome in organ transplant recipients with cryptococcosis: implications for the management of immunosuppression. *Clin Infect Dis*. 2015;60:36-44.
56. Singh N, Alexander BD, Lortholary O, et al. Cryptococcus neoformans in Organ Transplant Recipients: impact of Calcineurin-Inhibitor Agents on Mortality. *J Infect Dis*. 2007;195:756-764.
57. Vilchez RA, Linden P, Lacomis J, Costello P, Fung J, Kusne S. Acute respiratory failure associated with pulmonary cryptococcosis in non-aids patients. *Chest*. 2001;119:1865-1869.

**How to cite this article:** Ponzio V, Camargo LF, Medina-Pestana J, Perfect JR, Colombo AL. Outcomes of cryptococcosis in renal transplant recipients in a less-resourced health care system. *Transpl Infect Dis*. 2018;e12910. <https://doi.org/10.1111/tid.12910>

### 3.2. Artigo Científico 2

#### **“Genotypic diversity and clinical outcome of cryptococcosis in renal transplant recipients in Brazil”**

Publicado online em janeiro de 2019 no periódico “Emerging Microbes & Infection”, volume 8, número 1, páginas 119 a 129. A carta de aprovação está no **Apêndice 3**. Os resultados parciais desse estudo também foram apresentados na forma de pôster no 15º Infocus - Fórum de Infecções Fúngicas na Prática Clínica, realizado no período de 16 de outubro a 18 de novembro de 2017, na cidade de Curitiba, PR, Brasil.



## Emerging Microbes &amp; Infections

ISSN: (Print) 2222-1751 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/temi20>

## Genotypic diversity and clinical outcome of cryptococcosis in renal transplant recipients in Brazil

Vinicius Ponzio, Yuan Chen, Anderson Messias Rodrigues, Jennifer L. Tenor, Dena L. Toffaletti, José Osmar Medina-Pestana, Arnaldo Lopes Colombo & John R. Perfect

To cite this article: Vinicius Ponzio, Yuan Chen, Anderson Messias Rodrigues, Jennifer L. Tenor, Dena L. Toffaletti, José Osmar Medina-Pestana, Arnaldo Lopes Colombo & John R. Perfect (2019) Genotypic diversity and clinical outcome of cryptococcosis in renal transplant recipients in Brazil, *Emerging Microbes & Infections*, 8:1, 119-129, DOI: [10.1080/22221751.2018.1562849](https://doi.org/10.1080/22221751.2018.1562849)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/22221751.2018.1562849>



© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, on behalf of Shanghai Shangyixun Cultural Communication Co., Ltd



Published online: 21 Jan 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=temi20>





EMi



Taylor & Francis  
Taylor & Francis Group

OPEN ACCESS Check for updates

## Genotypic diversity and clinical outcome of cryptococcosis in renal transplant recipients in Brazil

Vinicius Ponzio<sup>a</sup>, Yuan Chen<sup>b</sup>, Anderson Messias Rodrigues<sup>c</sup>, Jennifer L. Tenor<sup>b</sup>, Dena L. Toffaletti<sup>b</sup>, José Osmar Medina-Pestana<sup>d</sup>, Arnaldo Lopes Colombo<sup>a</sup> and John R. Perfect<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil; <sup>b</sup>Division of Infectious Disease, Department of Medicine, Duke University School of Medicine, Durham, NC, USA; <sup>c</sup>Laboratory of Emerging Fungal Pathogens, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil; <sup>d</sup>Hospital do Rim Oswaldo Ramos Foundation, Discipline of Nephrology, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

### ABSTRACT

Genotypic diversity and fluconazole susceptibility of 82 *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from 60 renal transplant recipients in Brazil were characterized. Clinical characteristics of the patients and prognostic factors were analysed. Seventy-two (87.8%) isolates were *C. neoformans* and 10 (12.2%) were *C. gattii*. VNI was the most common molecular type (40 cases; 66.7%), followed by VNII (9 cases; 15%), VGII (6 cases; 10%), VNB (4 cases; 6.7%) and VNI/II (1 case; 1.7%). The isolates showed a high genetic diversity in the haplotype network and six new sequence types were described, most of them for VNB. There was a bias towards skin involvement in the non-VNI population ( $P = .012$ ). VGII isolates exhibited higher fluconazole minimum inhibitory concentrations compared to *C. neoformans* isolates ( $P = 0.008$ ). The 30-day mortality rate was 38.3%, and it was significantly associated with fungemia and absence of headache. Patients infected with VGII had a high mortality rate at 90 days (66.7%). A variety of molecular types produce disease in renal transplant recipients in Brazil and highlighted by VGII and VNB. We report the clinical appearance and impact of the molecular type, fluconazole susceptibility of the isolates, and clinical characteristics on patient outcome in this population.

**KEYWORDS** *Cryptococcus neoformans*; *Cryptococcus gattii*; molecular type; renal transplantation; genotypic diversity

### Introduction

Cryptococcosis is a life-threatening invasive fungal disease caused by the encapsulated yeasts, *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* [1]. *C. neoformans* has a worldwide distribution affecting predominantly individuals with impaired cell-mediated immunity and *C. gattii* has a more limited environmental distribution and a higher percentage of disease within apparently normal hosts [1]. In renal transplant recipients, cryptococcosis is recognized as the second most common invasive fungal infection, with incidence rates ranging from 0.3% to 5.8% and overall mortality rates as high as 20–50% [2–11].

The nomenclature of *C. neoformans*/*C. gattii* species complexes is continuing to evolve under molecular evidences [12,13]. However, as a starting point, cryptococcosis is caused primarily by two species *C. neoformans* and *C. gattii* and currently these species can be further divided into ten molecular siblings known as VNI, VNII, VNB, VNIII, VNIV, VGI, VGII, VGIII and VGIV [12] with a possible new molecular type designated VGV. The most widely utilized sequence-based genotyping method for the molecular identification of

these complexes has been multilocus sequence typing (MLST). This method is robust and portable between laboratories [14,15].

Clinical comparative studies and understandings between different cryptococcal molecular types are still in their infancy and remain controversial whether or not these different molecular types represent specific characteristics in terms of clinical manifestations or attributable mortality rates [13,16–18]. Furthermore, most data related to strain distribution of *C. neoformans* and *C. gattii* species complexes in the transplant recipient relies on small series and case report [5,19–23].

The purpose of our study was to characterize the molecular types of *C. neoformans* and *C. gattii* isolated and to assess the clinical outcome of cryptococcosis and their molecular types in patients undergoing renal transplantation throughout Brazil. Interestingly, Brazil represents an environment with a diverse number of cryptococcal molecular types and likely has the most cryptococcal strain diversity of any country practising routine kidney transplantation [24,25].

**CONTACT** Arnaldo Lopes Colombo [arnaldocolombo@gmail.com](mailto:arnaldocolombo@gmail.com) Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu, 740, 2nd floor, Vila Clementino, São Paulo, SP CEP: 04023-900, Brazil

Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/22221751.2018.1562849>.

© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, on behalf of Shanghai Shangyixun Cultural Communication Co., Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



## Results

### Clinical characteristics

We enrolled a total of 60 renal transplant recipients followed for a median period of 4 months (0 days to 11 years). One patient had received a liver transplant allograft one year before kidney transplantation and another patient had undergone simultaneous pancreas-kidney transplantation. The clinical characteristics are outlined in Table 1.

### Molecular characterization and clinical associations

We collected 82 isolates of *C. neoformans*/*C. gattii* species complexes from 60 renal transplant recipients. Ten

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of 60 renal transplant recipients infected by *C. neoformans*/*C. gattii* species complexes.

Characteristics	Value, % (no. of patients) n = 60
Age, average years (range)	49 (21–71)
Male	63.3 (38)
Ethnicity	
White	60 (36)
Non-white	40 (24)
Retransplant <sup>a</sup>	6.7 (4)
Donor type	
Deceased	60 (36)
Living	40 (24)
Immunosuppressive induction therapy	40 (24)
Immunosuppressive agents received <sup>b</sup>	
Prednisone	100 (60)
Tacrolimus	56.7 (34)
Mycophenolic acid <sup>c</sup>	55 (33)
Azathioprine	26.7 (16)
Cyclosporine A	18.3 (11)
Rapamycin	8.3 (5)
Prior rejection	40 (24)
Diabetes mellitus	26.7 (16)
Active cytomegalovirus infection	25 (15)
Hepatitis C infection	18.3 (11)
Time to onset of infection after transplant, average months (range)	30.5 (13 days to 17 years)
Sites of involvement	
CNS	83.3 (50)
Pulmonary	50 (30)
Skin, soft-tissue, or osteoarticular	20 (12)
Fungemia	38.3 (23)
Disseminated infection <sup>d</sup>	63.3 (38)
Renal failure at baseline <sup>e</sup>	56.7 (34)
Serum cryptococcal antigen titre, median (range) <sup>f</sup>	1:1024 (0–1:1024)
Change in immunosuppression at diagnosis <sup>g</sup>	78.6 (44)
Antifungal therapy	
Amphotericin B alone	60 (36)
Amphotericin B + 5FC	18.1 (11)
Amphotericin B + fluconazole	8.3 (5)
Fluconazole	3.3 (2)
None	10 (6)
Mortality at 90 days	45 (27)

Note: CNS, central nervous system; 5FC, 5-flucytosine.

<sup>a</sup>Indicates prior receipt of a renal transplant.

<sup>b</sup>Immunosuppressive agent that remained unchanged within 3 months of the onset of cryptococcosis.

<sup>c</sup>Includes mycophenolate mofetil or mycophenolate sodium.

<sup>d</sup>Defined as the involvement of at least two noncontiguous organ systems or the presence of fungemia.

<sup>e</sup>Indicates creatinine  $\geq 2$  mg dL<sup>-1</sup> at the time of diagnosis of infection.

<sup>f</sup>Data available for 35 patients.

<sup>g</sup>Data available for 56 patients.

(12.2%) isolates were identified as *C. gattii* and 72 (87.8%) isolates as *C. neoformans* (Figure 1(A)). Forty-seven isolates were from cerebrospinal fluid (CSF), 23 from blood, 6 from pulmonary secretions, 5 from skin biopsy and 1 from urine. The distribution of different molecular types among the patients is depicted in Figure 1. The most common molecular type was VNI (51 isolates from 40 patients). For 20 episodes on which there were more than one isolate per patient, all but two exhibited similar molecular type within the same episode. In both patients infected by different molecular types we isolated VNI followed by VNII separated by 15 days in CSF or 44 days in blood. These two cases had their findings confirmed by three independent assays yielding the same results. In our entire cohort, only one isolate was diploid based on flow cytometry (VNI/VNII).

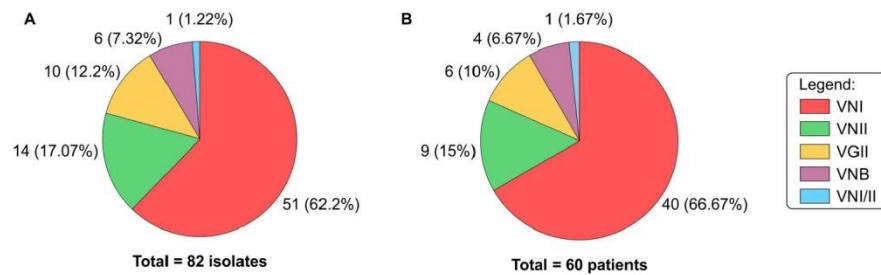
A total of 81 isolates were analysed by MLST and compared to MLST database. Nine allele types have been identified for the *URA5* locus (1 new), 10 for *LAC1* (1 new), 9 *SOD1* (1 new), 14 for *IGS1* region (3 new), 10 for *CAP59* (1 new), 11 for *PLB1* and 8 for *GPD1* (1 new). Based on the combined analysis of the 7 MLST loci for *C. neoformans*, 20 sequence types (ST) were found, in which 6 were new (ST581, ST587, ST588, ST589, ST590 and ST591). Of those new ST, four were VNB molecular type and two VNII (Supplementary Table 1).

Figure 2 shows the phylogenetic tree of one representative sequence for each haplotype found for these transplant recipient isolates in relationship to reference strains. Our VGII isolates did not cluster with VGIIa, VGIIb or VGIIc.

For haplotype analyses we employed a dataset of 144 sequences (7 loci) from *C. neoformans*/*C. gattii* species complexes, being 81 generated in this study and 63 recovered from GenBank (Supplementary Table 1). Haplotype and nucleotide diversities were high in our overall dataset (number of haplotypes = 71; Hd = 0.961;  $\pi$  = 0.07003) and also specifically within our 81 transplant recipient isolates (Hd = 0.890;  $\pi$  = 0.03379). Remarkably, 24 out of 71 different haplotypes found in the full dataset for *C. neoformans*/*C. gattii* species complexes originated from transplant recipients. Only four haplotypes (H14, H15, H17 and H25) were identical to reference strains, revealing the high diversity of our isolates (Figure 3; Supplementary Table 1).

Regarding clinical correlations, patients infected by *C. gattii* were more likely to be a retransplant than those infected with *C. neoformans* ( $P$  = .046) (Table 2). Furthermore, patients infected with non-VNI molecular types were significantly more likely to have skin involvement than patients infected with VNI (40% vs. 10% patients, respectively; OR = 5.77; 95% CI = 1.47–22.56;  $P$  = .012).

Fluconazole minimum inhibitory concentration (MIC) distributions for *C. neoformans* and *C. gattii* isolates varied as depicted in Table 3. Modal MICs were



**Figure 1.** Molecular type distribution of 82 clinical isolates of *C. neoformans/C. gattii* species complexes (A) cultured from 60 renal transplant recipients (B).

2–16 mg l<sup>-1</sup>, with the higher mode for VGII (16 mg l<sup>-1</sup>) and lowest mode for VNII (2 mg l<sup>-1</sup>). For example, 13 out of 82 (15.85%) isolates exhibited fluconazole MIC values that were  $\geq 16$  mg l<sup>-1</sup>, in which 8 (61.54%) were represented by molecular type VGII (Figure 3(A)). By multivariate analysis, fluconazole MIC values were higher in patients infected by *C. gattii* when compared to *C. neoformans* (OR = 12.62; 95% CI = 1.97–80.99;  $P = .008$ ) (Table 2).

#### Mortality and prognostic factors

In our study, 23 out of 60 patients (38.3%) died within 30 days after diagnosis of cryptococcosis, and 4 more (total of 45%) died within 90 days. Finally, the overall mortality rate in our study group was 61.7% (37/60), over the entire follow-up period. Based on the univariate analysis, the following factors were significantly associated with high mortality at 30 days: induction immunosuppressive therapy, deceased donor, receipt of a calcineurin-inhibitor agent, pulmonary infection, fungemia, somnolence and absence of headache at admission, CSF antigen titre  $>1:512$  at diagnosis, positive pulmonary culture, discontinuation of tacrolimus after infection, graft loss within 30 days and patients infected with isolates showing MIC  $\geq 16$  mg l<sup>-1</sup>. After multivariate regression analysis, the factors independently associated with 30-day mortality were fungemia (OR = 3.79;  $p = .044$ ) and absence of headache (OR = 0.13;  $p = .001$ ) (Table 4). Most of our patients infected by VGII died within 90 days after cryptococcosis onset. In contrast, there was high survival rate of patients infected by VNII haplotype (Figure 3(B)). Furthermore, the probability of survival after 12 weeks of cryptococcosis was significantly lower in patients infected with isolates exhibiting fluconazole MICs  $\geq 16$  mg l<sup>-1</sup> compared to those with MICs  $< 16$  mg l<sup>-1</sup> ( $P < .001$ , log rank test) (Figure 4).

#### Discussion

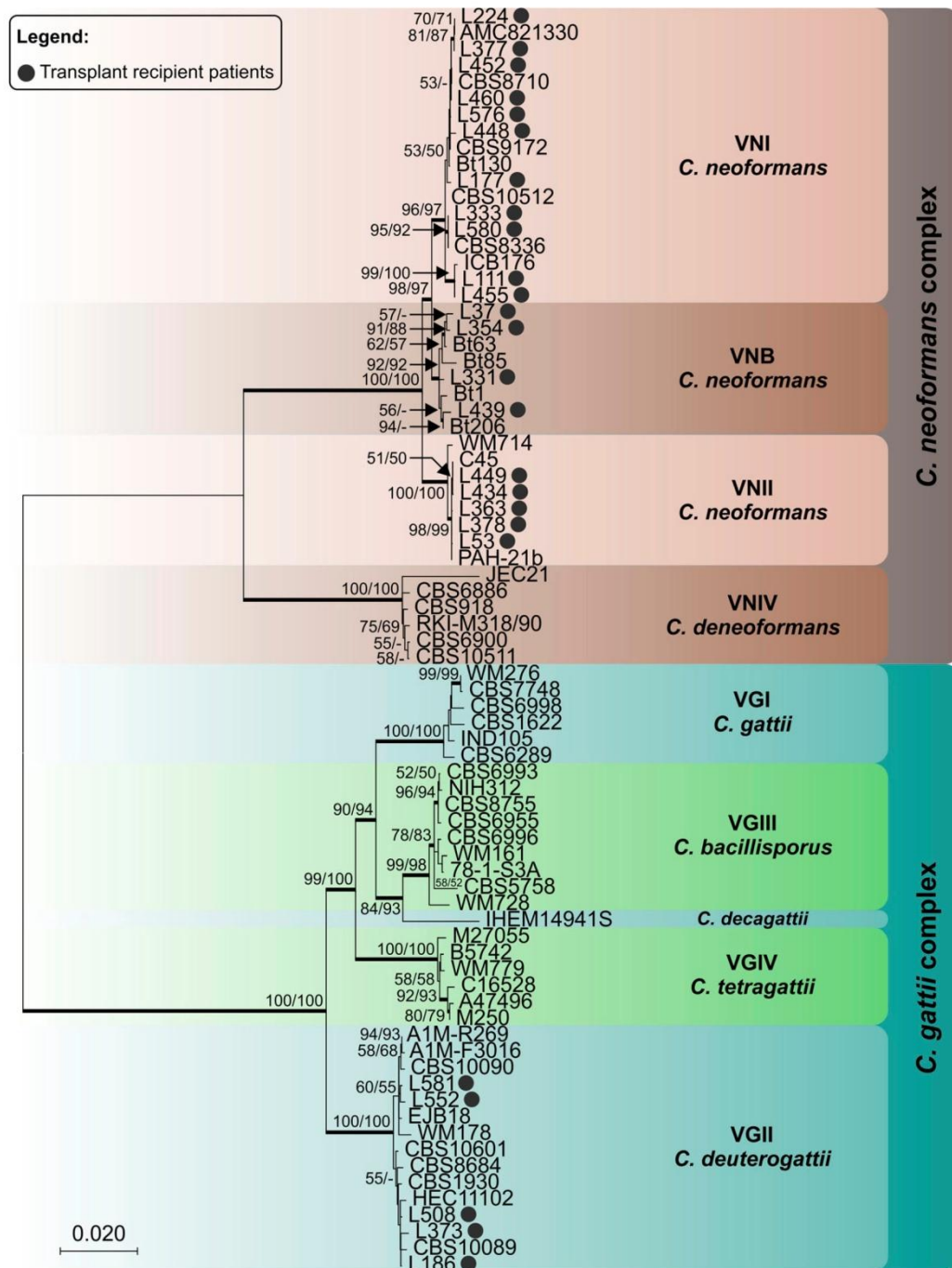
Our retrospective analysis describes 60 cases of cryptococcosis among renal transplant recipients documented during a period of 26 years. The patients presented with

high rates of fungemia (38.3%), common disseminated infection (63.3%), and substantial 90-day mortality (45%). These data are comparable to some prior studies evaluating cryptococcosis in renal transplant recipients [3,5–8,26,27]. However, lower rates of mortality have been recently reported among all types of solid transplant recipients in high resource-available countries [2,9–11,26–28]. Furthermore, in our cohort of transplant recipients infected by *C. gattii*, there was an impressive 66.7% mortality rate within 90 days. Similarly, other investigators have found high rates of dissemination (63.6%) and a high 90-day mortality (36%) for solid organ transplant (SOT) recipients infected by *C. gattii* [19]. These observations emphasize the potential need for clinicians to know the identification of the species of *Cryptococcus* in an individual transplant recipient infection for prognostic determination and possibly management alterations.

We observed clinically that fungemia and absence of headache were significantly correlated with decreased survival in our kidney transplant recipients. These characteristics are likely to identify a patient with a high burden of yeasts and/or late diagnosis. These clinical characteristics have been found to be poor prognostic features in other patient populations [29,30].

In Brazil, most cryptococcal molecular types in infections are represented. Indeed, MLST and whole-genome based population analyses suggest that Brazil could be a global centre for diversity of *C. neoformans/C. gattii* species complexes and even a location for species origin [21,25,31–33]. However, studies addressing the distribution of specific molecular types of *Cryptococcus* infecting transplant recipients remain scarce worldwide. In the setting of SOT, one study in China revealed 9 cases of VNI and a recent study described 10 strains of molecular type VGII and one of VGI from the Pacific Northwest of USA outbreak. In this last study, 18% of the strains in transplant recipients were *C. gattii* [5,19]. We found in our cohort of renal transplant recipients that *C. gattii* represented 12% of isolates (VGII). While VNI was the most common molecular type infecting our patients (66.7%), some genotypic diversity with *C. neoformans* was also found as we detected 14 VNII and 6 VNB isolates. The molecular predominance of VGII may



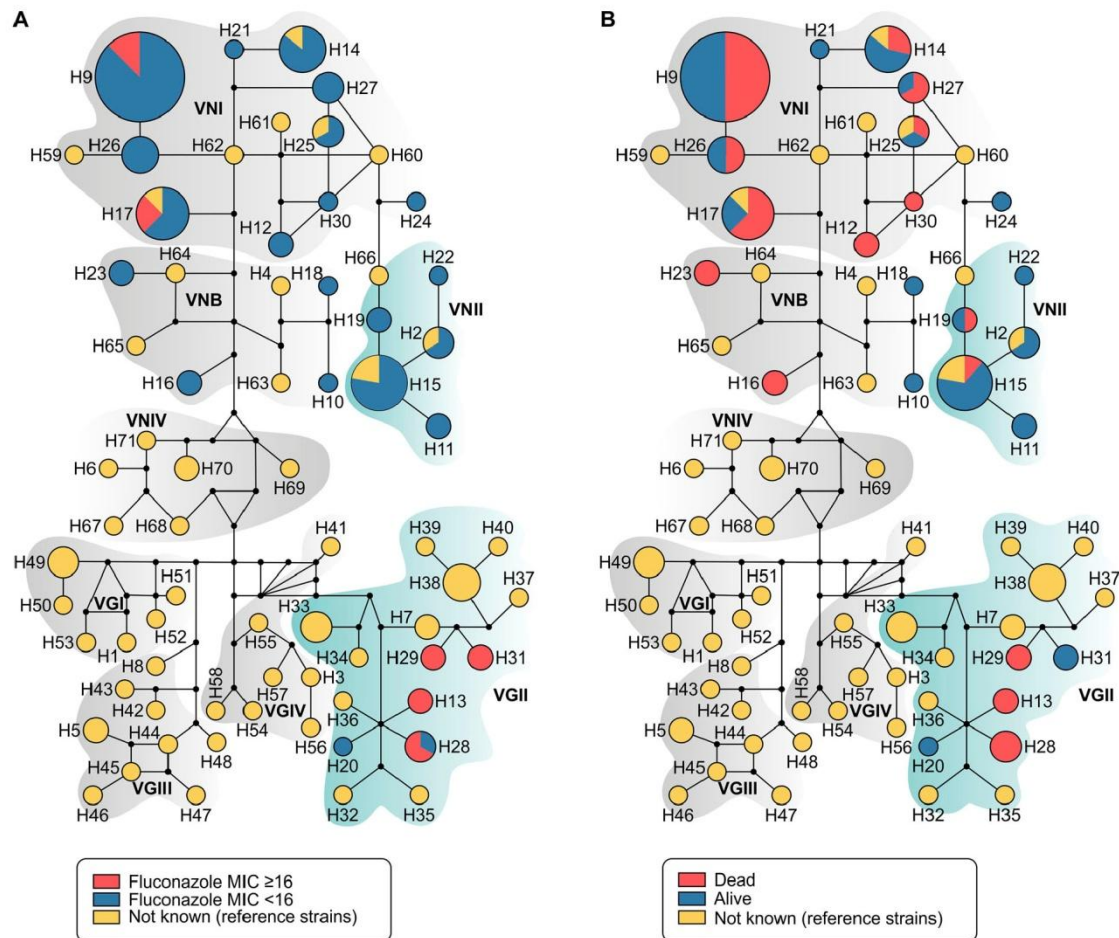


**Figure 2.** Phylogenetic relationships as inferred from a maximum likelihood analysis of *CAP59*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*, *TEF1* and *IGS1* sequences from 82 strains of *C. neoformans* and *C. gattii* from transplant patients and 63 reference strains, covering the main molecular types described. The numbers close to the branches represent indices of support (maximum likelihood/neighbor-joining) based on 1000 bootstrap replications. The branches with bootstrap support higher than 70% are indicated in bold.

represent either a specific tropism for transplant recipients and/or increased resistance to tacrolimus/cyclosporine or more likely higher exposure to VGII in the environment over the other VG molecular types. A higher frequency of *C. gattii* disease observed in retransplantation recipients supports the hypothesis that cryptococcal disease of immunocompromised hosts with *C. gattii* may be more a primary disease while

*C. neoformans* disease more frequently represents secondary or reactivation disease [4].

Surprisingly we found VNB isolates of *C. neoformans* in this Brazilian cohort, a molecular type that was considered to be geographically restricted to Africa [34]. However, recently, almost a dozen clinical and environmental isolates from Italy, Portugal, China and Brazil have been identified as VNB strains [20,35–39]. In



**Figure 3.** Median-joining haplotype network of 144 isolates of *C. neoformans*/*C. gattii* species complexes (81 isolates originated in this study in addition to 63 reference strains recovered from literature), covering all the concatenated loci *CAP59*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*, *TEF1* and *IGS1* sequences. The isolates are coded, and their frequencies are represented by (A) fluconazole MIC  $\geq$  than 16 mg l<sup>-1</sup> from transplant recipients isolates or (B) 90-days mortality of transplant recipients. The size of the circumference is proportional to the haplotype frequency. The black dots (median vectors) represent unsampled or extinct haplotypes in the population. Further information about isolate source and GenBank accession number can be found in the Supplementary Table 1.

fact, a recent study comparing Brazilian VNB isolates from transplant recipients with African isolates showed a high diversity within these isolates, except for one isolate from Brazil that nested deeply within the African clade on the phylogeny tree [31]. This isolate was recovered from a mulatto patient living in São Paulo and might have corresponded to a recent migration event. However, VNB isolates as a whole may support the fact that their geographical niche was separated during the Pangea period in which continents split [40].

The Next Generation MLST (NGMLST) methodology and primers that we used were not able to properly sequence the *GPD1* locus for VGII molecular type as previously reported [14]. Another issue for our genotyping analysis was our inability to precisely separate our VGII isolates into three distinct clonal lineages (VGIIa, VGIIb and VGIIc). MLST and whole-population genome studies comparing the VGII outbreak strains with VGII isolates from other regions showed that isolates,

especially from south of Brazil, have not clustered with any of the three specific lineages [25,33,41].

The clinical impact of different cryptococcal molecular types on patient outcome is still unknown. Controversial results have been generated in the correlation between molecular types and virulence based on experimental studies [13,16,18] and clinical data [17,20,42,43]. We failed to demonstrate substantial differences in clinical presentation or outcome by molecular types, except that non-VNI molecular strains were significantly more likely to show skin involvement than patients infected by VNI strains. There were also no significant differences in outcomes between the *C. neoformans* and *C. gattii* infections with the important caveat that there were fewer *C. gattii* strains and all were VGII. Consequently, the statistical power to detect differences in our study is limited. However, these initial observations support the hypothesis that virulence is not consistently associated with a single major molecular type



**Table 2.** Comparisons of infections due to *C. neoformans* and *C. gattii* complex in 60 renal transplant recipients.

Characteristics (Nº. patients) n = 60	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	<i>C. neoformans</i> infection % (Nº. of patients) n = 54	<i>C. gattii</i> infection % (Nº. of patients) n = 6	P-value	OR	95% CI	P-value
Age, average years (range)	49 (21–69)	50.5 (32–71)	0.796			
Male	66.7 (36)	33.3 (2)	0.179			
White	61.1 (33)	33.3 (2)	0.223			
Living in the capital before infection	27.8 (15)	6.3 (1)	1.0			
Northeast of Brazil as place of birth	31.5 (17)	50 (3)	0.390			
<b>Retransplant<sup>a</sup></b>	<b>3.7 (2)</b>	<b>33.3 (2)</b>	<b>0.046</b>			
Deceased donor type	57.4 (31)	83.3 (5)	0.387			
Induction immunosuppressive therapy	38.9 (21)	50 (3)	0.675			
Prior rejection	38.9 (21)	50 (3)	0.675			
Cytomegalovirus infection	25.9 (14)	16.7 (1)	1.0			
Time to onset of infection after transplant, average months (range)	30 (13 days–17 years)	37.5 (188 days–7 years)	0.667			
Sites of involvement						
CNS (56)	90.6 (48)	66.7 (2)	0.293			
Pulmonary (59)	48.1 (26)	80 (4)	0.353			
Skin, soft-tissue, or osteoarticular	16.7 (9)	50 (3)	0.088			
Fungemia	35.2 (19)	66.7 (4)	0.191			
Disseminated infection <sup>b</sup>	61.1 (33)	83.3 (5)	0.4			
Renal failure at baseline <sup>c</sup>	53.7 (29)	83.3 (5)	0.221			
CNS image abnormality (37)	20 (7)	0 (0)	1.0			
Diffuse infiltrate in lung image (27)	37.5 (9)	0 (0)	0.529			
Serum cryptococcal antigen titre $\geq 1:512$ (31)	57.1 (16)	100 (3)	0.265			
Mean duration of hospitalization, $\pm$ SD (range), days	36.8 $\pm$ 38.19 (1–245)	9.33 $\pm$ 11.89 (8–33)	0.087			
Duration of antifungal induction therapy, average days (range) (54)	26.3 (1–219)	16 (4–28)	0.504			
Total duration of antifungal therapy, average days (range) (51)	115 (1–635)	288.5 (193–384)	0.453			
<b>Fluconazole MIC <math>\geq 16</math> mg l<sup>-1</sup></b>	<b>7.4 (4)</b>	<b>66.7 (4)</b>	<b>0.002</b>	<b>12.62</b>	<b>1.97–80.99</b>	<b>0.008</b>
Mortality at 90 days	42.6 (23)	66.7 (4)	0.394			

Note: CNS, central nervous system; SD, standard deviation; MIC, minimum inhibitory concentration.

<sup>a</sup>Indicates prior receipt of a renal transplant.

<sup>b</sup>Defined as the involvement of at least two noncontiguous organ systems or the presence of fungemia.

<sup>c</sup>Indicates creatinine  $\geq 2$  mg dL<sup>-1</sup> at the time of diagnosis of infection.

or subtype but may be more related to the distinct properties of individual isolates.

Fluconazole susceptibility profile is a potentially important clinical issue but its relevance in terms of precisely determining prognosis is still controversial, especially in the setting of the transplant population [5,19,44,45]. In general, direct correlation between species type and antifungal susceptibility has varied [18,21,46–48]. Our VGII isolates showed high fluconazole MICs. Furthermore, in our study, infection by *C. neoformans*/*C. gattii* species complex isolates exhibiting high fluconazole MICs did correlate with a worse patient survival rate. However, the precise clinical correlation of *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus* and break points remains to be further defined [49–53].

In conclusion, cryptococcosis in the setting of SOT in less-resourced countries should be considered a life-threatening fungal disease with substantial mortality rates. The high mortality is probably due to late diagnosis, suboptimal antifungal therapy, including lack of 5FC, as well as the virulence properties of these fungi in SOT. In fact, this transplant population in Brazil represents a relatively uniform host with high rates of mortality for cryptococcosis that may allow for the detection and characterization of particularly virulent strains. With this diversity of strains and a similar high-risk host population for mortality, further examination of these transplant cohorts in Brazil and their fungal strains may give us signals into how these yeasts specifically cause aggressive disease.

**Table 3.** Fluconazole MIC distribution for 82 isolates of *C. neoformans*/*C. gattii* species complexes tested.

Molecular type or specie	Number of isolates	Mean mg l <sup>-1</sup>	Interval mg l <sup>-1</sup>	MIC50 mg l <sup>-1</sup>	MIC90 mg l <sup>-1</sup>	No. of isolates for which the MIC (mg l <sup>-1</sup> ) was <sup>a</sup> :									
						$\leq 0.12$	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	$\geq 64$
All isolates	82	8.70	0.25–64	8	16	1			3	11	20	<u>34</u>	9	2	2
<i>C. neoformans</i>	72	6.18	0.25–16	8	8	1			3	10	19	<u>33</u>	5		
VNI	51	7.22	0.25–16	8	8	1				2	15	<u>28</u>	5		
VNII	14	2.50	1–8	2	4				3	<u>8</u>	2	<u>1</u>			
VNB	6	6.86	4–8	8	8						2	<u>4</u>			
VNI/II	1										1				
<i>C. gattii</i> – VGII	10	25.82	4–64	16	64						1	<u>1</u>	<u>4</u>	2	2

Note: MIC, minimum inhibitory concentration.

<sup>a</sup>The modal MIC for each distribution is underlined.

**Table 4.** Variables associated with 30-day mortality after cryptococcosis in 60 renal transplant recipients.

Variables (N°. patients) n = 60	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Survival, % n = 37	Death, % n = 23	P-value	OR	95% CI	P-value
Age, mean, $\pm$ SD, years (60)	48.1 $\pm$ 12.51	49.6 $\pm$ 12.94	0.657			
Male (38)	56.8	73.9	0.180			
Induction immunosuppressive therapy (24)	27	60.9	<b>0.009</b>			
Deceased donor (36)	48.6	78.2	<b>0.023</b>			
Prior rejection (24)	43.2	34.8	0.515			
Cytomegalovirus infection <sup>a</sup> (7)	13.5	8.7	0.697			
Receipt of a calcineurin-inhibitor agent <sup>b</sup> (45)	64.9	91.3	<b>0.021</b>			
Receipt of a tacrolimus <sup>b</sup> (34)	45.9	73.9	<b>0.034</b>			
Duration of symptoms before diagnosis, mean, $\pm$ SD (56)	35.4 $\pm$ 42.69	29.2 $\pm$ 78.74	0.705			
Time to diagnose after admission, mean, $\pm$ SD (57)	4.7 $\pm$ 9.09	3.6 $\pm$ 4.65	0.585			
Sites of involvement						
CNS <sup>c</sup> (50)	89.2	89.5	1			
Pulmonary <sup>d</sup> (30)	40.5	68.2	<b>0.04</b>			
Skin or soft-tissue (12)	24.3	13	0.34			
Disseminated infection (38)	54.1	78.3	0.059			
<b>Fungemia (23)</b>	<b>18.9</b>	<b>69.6</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>3.79</b>	<b>1.03–13.91</b>	<b>0.044</b>
<i>C. gattii</i> infection (6)	5.4	17.4	0.191			
Non-VNI genotype (20)	32.4	34.5	0.851			
Creatinine at admission $\geq$ 2 mg dL <sup>-1</sup> (34)	51.4	65.2	0.292			
Somnolence at admission <sup>e</sup> (19)	27.3	58.8	<b>0.029</b>			
Confusion at admission <sup>e</sup> (19)	30.3	52.9	0.118			
<b>Headache at admission<sup>e</sup> (30)</b>	<b>72.7</b>	<b>35.3</b>	<b>0.01</b>	<b>0.13</b>	<b>0.04–0.42</b>	<b>0.001</b>
Intracranial hypertension <sup>f</sup> (16)	48.1	33.3	0.7			
Respiratory failure <sup>g,h</sup> (7)	6.7	40	0.08			
CSF cell count <sup>b</sup> , mean, $\pm$ SD, mm <sup>3</sup> (42)	138.5 $\pm$ 250.04	101.1 $\pm$ 92.8	0.664			
CSF glucose ratio <sup>b</sup> , mean, $\pm$ SD, mg dL <sup>-1</sup> (41)	47.3 $\pm$ 24.63	39.2 $\pm$ 31.89	0.420			
Positive CSF India ink <sup>h</sup> (23)	42.4	64.3	0.170			
CSF antigen titre $>1:512^i$ (24)	43.3	84.6	<b>0.012</b>			
Positive pulmonary culture <sup>j</sup> (9)	33.3	100	<b>0.021</b>			
AMBd as primary therapy <sup>k</sup> (53)	97.3	100	1			
Combination therapy <sup>k</sup> (16)	24.3	41.2	0.208			
Change in immunosuppressive regime after infection <sup>c</sup> (44)	80.6	75	0.737			
Discontinuation of tacrolimus after infection <sup>l</sup> (24)	41.4	80	<b>0.025</b>			
Graft loss within 30 days <sup>m</sup> (7)	13.5	100	<b>0.028</b>			
Fluconazole MIC $\geq$ 16 mg l <sup>-1</sup> (8)	25	75	<b>0.045</b>			

Note: OR, odds ratio; CI, confidence interval; SD, standard deviation; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; AMBd, amphotericin B deoxycholate; MIC, minimum inhibitory concentration.

<sup>a</sup>Infection occurring within 6 months of the onset of cryptococcosis.

<sup>b</sup>At cryptococcosis diagnosis.

<sup>c</sup>Data was available for 56 patients.

<sup>d</sup>Data was available for 59 patients.

<sup>e</sup>Data was available for 50 patients.

<sup>f</sup>Data was available for 36 patients.

<sup>g</sup>Data was available for 30 patients.

<sup>h</sup>Data was available for 47 patients.

<sup>i</sup>Data was available for 43 patients.

<sup>j</sup>Data was available for 13 patients.

<sup>k</sup>Data was available for 54 patients, at least 2 consecutive days of the same antifungal therapy.

<sup>l</sup>Data was available for 44 patients.

<sup>m</sup>Data was available for 39 patients.

## Materials and methods

### Isolates

We evaluated all *C. neoformans* and *C. gattii* strains isolated from patients who underwent renal transplantation and subsequently developed cryptococcosis from 1987 to 2013 at São Paulo Hospital or the Kidney Hospital in São Paulo. The isolates were stored in cryopreservative medium at  $-70^{\circ}\text{C}$  with Yeast Peptone Dextrose (YPD) and 20% glycerol at the Special Mycology Laboratory – Federal University of São Paulo.

### Clinical data and definitions

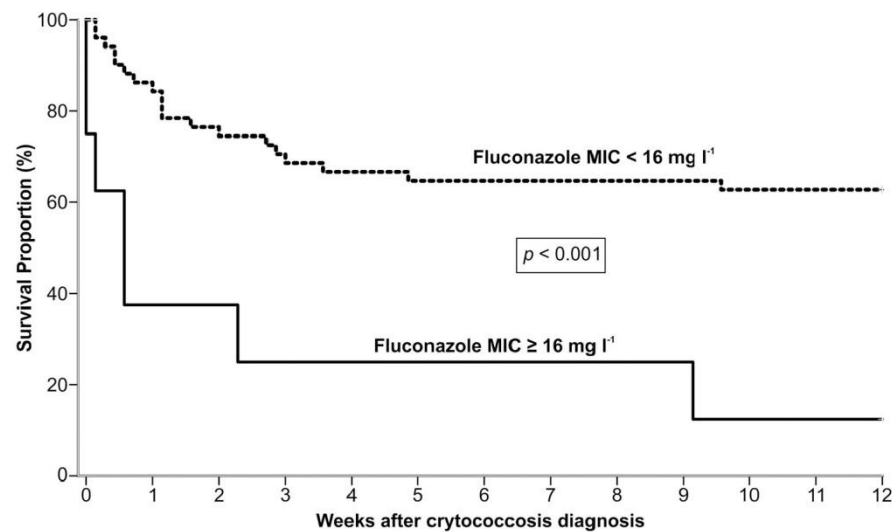
The following variables were collected from the medical records using a standard clinical report form: demographic data, complications prior to and after

transplantation, immunosuppressive regimens, antifungal therapy, and laboratory data. Disseminated cryptococcosis was defined as the involvement of at least two noncontiguous organ systems or the presence of fungemia [6]. Primary therapy was defined as the first systemic antifungal regimen administered for at least two consecutive days [54]. The study was approved by the local ethic committee (UNIFESP Number: 318847, 2013).

### Genotyping

A single colony of each isolate was isolated, grown in YPD broth and frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  with glycerol. To isolate genomic DNA, the isolates were streaked from these frozen stocks onto fresh YPD agar, grown for 2–4 days. Next, several colonies of each sample were





**Figure 4.** Kaplan–Meier analysis of 12 weeks survival of 60 renal transplant recipient infected by *C. neoformans*/*C. gattii* species complexes according to fluconazole MIC  $\geq 16$  mg l<sup>-1</sup> ( $n = 8$ ) or MIC  $< 16$  mg l<sup>-1</sup> ( $n = 52$ ).

used to extract and purify the genomic DNA, using the MasterPure Yeast DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). We analysed the sequences from eight loci, including seven standard gene regions (*CAP59*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*, *TEF1*, *GPD1*) and the intergenic spacer region 1 (*IGS1*) of the nuclear ribosomal RNA gene. The primer sequences and the preparation of the sequencing libraries were based on the NGMLST method previously described and the raw sequencing data was processed using MLSTEZ [14]. The allele type of each generated consensus sequence for every locus was determined using the MLST database (<http://mlst.mycologylab.org>).

The phylogenetic analysis was performed using MEGA 7.0 [55]. The evolutionary relationships, with 1000 bootstrap replicates of the concatenated nucleotide sequences, were inferred using maximum likelihood and the neighbor-joining methods [56]. Major molecular types were confirmed according to phylogenetic clustering with reference strains. Evolutionary relationships at the intraspecific level were evaluated using haplotype networks in order to visualize differences and diversity among isolates. Haplotype and nucleotide diversities were estimated using DNAsp v5.0 [57]. Median-joining networks for the dataset were obtained and visualized using the software Network 5.0 (Fluxus Technology). Flow cytometry was used to check ploidy of the hybrid isolate [58].

#### Antifungal susceptibility testing

The determination of MICs for fluconazole was performed using the CLSI broth microdilution assay, according to the M27-A3 document [59]. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida krusei* ATCC 6258

were included as quality controls. Assays were performed in RPMI with endpoints read after 72 h at 35°C. The MIC was defined as the lowest concentration that produced 50% growth inhibition compared with the drug-free growth control. The interpretation of MIC values was based on epidemiological cutoff values [60].

#### Statistical analysis

Continuous data were presented as either the mean  $\pm$  SD or the median and range, and categorical data were presented as proportions. Univariate analyses were performed to compare categorical variables using either the Chi-square or Fisher's exact test as appropriate and continuous variables by Student's *t*-test. Variables whose univariate test result had a *P*-value  $< .1$  were considered candidates for the multivariate model. Binary logistic models were generated using forward stepwise selection for factors associated with death and comparisons between molecular types and species. All analyses were performed using SPSS software for Windows, version 22 (SPSS, Chicago, IL). A value of  $P \leq .05$  was considered statistically significant.

#### Data availability

The sequences of all newly identified allele types have been submitted to the MLST database (<http://mlst.mycologylab.org>) and GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

#### Acknowledgements

The authors are grateful to the clinical staff of the hospitals involved, the Perfect Laboratory and all adjacent facilities



at Duke University School of Medicine and the Special Mycology Laboratory, Division of Infectious Disease – Federal University of São Paulo. V.P., A.L.C. and J.R.P. were responsible for study design, data analysis and manuscript writing. V.P., J.L.P. and D.L.T. carried out experiments. V.P. performed statistical analysis. V.P., Y.C. and A.M.R. performed bioinformatics analysis and manuscript writing. All the authors reviewed, approved and contributed to the final version of the manuscript.

### Disclosure statement

V.P.: Educational grants from Pfizer, Gilead Sciences-United Medical (Brazil), Merck Sharp and Dohme, Astellas, TEVA and Sanofi. Y.C., A.M.R., J.L.T., D.L.T., J.O.M.: report no conflicts of interest. A.L.C.: Educational grants from Pfizer, Gilead Sciences-United Medical (Brazil), Merck Sharp and Dohme, and a research grant from Astellas and Pfizer; J.R.P.: Grants, consultant fees, and honorariums from Astellas, Pfizer, Merck, TEVA, F-2G, Matinas, Viamet, Amplyx, Vical and Cidara.

### Funding

V.P.: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES 7571-13-8) scholarship. Y.C., J.L.T., D.L.T., J.O.M. have declared no funding. A.L.C.: National Council of Technological and Scientific Development (CNPQ 307510/2015-8). J.R.P.: Public Health Service Grants AI73896, AI04533 and AI93257 (JRP). A.M.R. is a fellow of São Paulo Research Foundation (FAPESP 2017/27265-5).

### ORCID

Vinicius Ponzio  <http://orcid.org/0000-0003-2991-3084>  
Anderson Messias Rodrigues  <http://orcid.org/0000-0003-0891-4563>  
Arnaldo Lopes Colombo  <http://orcid.org/0000-0003-0793-8491>

### References

- [1] Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30:179–206.
- [2] Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the transplant-associated infection surveillance network (TRANSNET). *Clin Infect Dis.* 2010;50:1101–1111.
- [3] Ponzio V, Camargo LF, Medina-Pestana J, et al. Outcomes of cryptococcosis in renal transplant recipients in a less-resourced health care system. *Transplant Infect Dis.* 2018;20:e12910.
- [4] Baddley JW, Forrest GN, AST Infectious Diseases Community of Practice. Cryptococcosis in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13 (Suppl 4):242–249.
- [5] Yang YL, Chen M, Gu J-I, et al. Cryptococcosis in kidney transplant recipients in a Chinese university hospital and a review of published cases. *Int J Infect Dis.* 2014;26:154–161.
- [6] Vilchez R, Shapiro R, McCurry K, et al. Longitudinal study of cryptococcosis in adult solid-organ transplant recipients. *Transpl Int.* 2003;16:336–340.
- [7] Guimaraes LF, Halpern M, de Lemos AS, et al. Invasive fungal disease in renal transplant recipients at a Brazilian center: local epidemiology matters. *Transplantation Proc.* 2016;48:2306–2309.
- [8] Marques S, Carmo R, Ferreira I, et al. Cryptococcosis in renal transplant recipients: a single-center experience. *Transplantation Proc.* 2016;48:2289–2293.
- [9] Osawa R, Alexander BD, Forrest GN, et al. Geographic differences in disease expression of cryptococcosis in solid organ transplant recipients in the United States. *Ann Transplant.* 2010;15:77–83.
- [10] Davis JA, Horn DL, Marr KA, et al. Central nervous system involvement in cryptococcal infection in individuals after solid organ transplantation or with AIDS. *Transplant Infect Dis.* 2009;11:432–437.
- [11] Gassie I, McDougall D, Douglas J, et al. Cryptococcal infections in solid organ transplant recipients over a 15-year period at a state transplant center. *Transpl Infect Dis.* 2017;19:e12639.
- [12] Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, et al. The case for adopting the ‘species complex’ nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *mSphere.* 2017;2:pii: e00357-16.
- [13] Hagen F, Khayhan K, Theelen B, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol.* 2015;78:16–48.
- [14] Chen Y, Frazzitta AE, Litvintseva AP, et al. Next generation multilocus sequence typing (NGMLST) and the analytical software program MLSTEZ enable efficient, cost-effective, high-throughput, multilocus sequencing typing. *Fungal Genet Biol.* 2015;75:64–71.
- [15] Munoz M, Camargo M, Ramirez JD. Estimating the intra-taxa diversity, population genetic structure, and evolutionary pathways of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Front Genet.* 2018;9:148.
- [16] Firacative C, Duan S, Meyer W, et al. Galleria mellonella model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS One.* 2014;9:e105076.
- [17] Beale MA, Sabiiti W, Robertson EJ, et al. Genotypic diversity is associated with clinical outcome and phenotype in cryptococcal meningitis across Southern Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0003847.
- [18] Thompson GR, Albert N, Hodge G, et al. Phenotypic differences of cryptococcus molecular types and their implications for virulence in a drosophila model of infection. *Infect Immun.* 2014;82:3058–3065.
- [19] Forrest GN, Bhalla P, DeBess EE, et al. *Cryptococcus gattii* infection in solid organ transplant recipients: description of Oregon outbreak cases. *Transplant Infect Dis.* 2015;17:467–476.
- [20] Andrade-Silva LE, Ferreira-Paim K, Ferreira TB, et al. Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. *PLoS One.* 2018;13: e0193237.
- [21] Herkert PF, Meis JF, Lucca de Oliveira Salvador G, et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* sensu stricto from southern Brazil. *J Med Microbiol.* 2018;67:560–569.
- [22] Cicora F, Petroni J, Formosa P, et al. A rare case of *Cryptococcus gattii* pneumonia in a renal transplant patient. *Transplant Infect Dis.* 2015;17:463–466.



- [23] Chen SC, Slavin MA, Heath CH, et al. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. *Clin Infect Dis*. 2012;55:789–798.
- [24] Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Fonseca FM, et al. MLST-based population genetic analysis in a global context reveals clonality amongst *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI isolates from HIV patients in Southeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:e0005223.
- [25] Souto AC, Bonfietti LX, Ferreira-Paim K, et al. Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the Amazon rainforest to the semi-arid desert in the Northeast of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004885.
- [26] Sun HY, Wagener MM, Singh N. Cryptococcosis in solid-organ, hematopoietic stem cell, and tissue transplant recipients: evidence-based evolving trends. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1566–1576.
- [27] Singh N, Alexander BD, Lortholary O, et al. *Cryptococcus neoformans* in organ transplant recipients: impact of calcineurin-inhibitor agents on mortality. *J Infect Dis*. 2007;195:756–764.
- [28] George IA, Spec A, Powderly WG, et al. Comparative epidemiology and outcomes of human immunodeficiency virus (HIV), Non-HIV non-transplant, and solid organ transplant associated cryptococcosis: a population-based study. *Clin Infect Dis*. 2018;66:608–611.
- [29] Dismukes WE, Cloud G, Gallis HA, et al. Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. *N Engl J Med*. 1987;317:334–341.
- [30] Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with cryptococcosis according to immune status. *PloS One*. 2013;8:e60431.
- [31] Rhodes J, Desjardins CA, Sykes SM, et al. Tracing genetic exchange and biogeography of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* at the global population level. *Genetics*. 2017;207:327–346.
- [32] Hagen F, Ceresini PC, Polacheck I, et al. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. *PloS One*. 2013;8:e71148.
- [33] Engelthaler DM, Hicks ND, Gillette JD, et al. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal. *MBio*. 2014;5:e01464–14.
- [34] Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, et al. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics*. 2005;172:2223–2238.
- [35] Barreto de Oliveira MT, Boekhout T, Theelen B, et al. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1356–1359.
- [36] Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res*. 2006;6:599–607.
- [37] Ngamskulrungron P, Gilgado F, Faganello J, et al. Genetic diversity of the cryptococcus species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. *PloS One*. 2009;4:e5862.
- [38] Dou HT, Xu YC, Wang HZ, et al. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in China between 2007 and 2013 using multilocus sequence typing and the DiversiLab system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:753–762.
- [39] Cogliati M, Prigitano A, Esposto MC, et al. Epidemiological trends of cryptococcosis in Italy: molecular typing and susceptibility pattern of *Cryptococcus neoformans* isolates collected during a 20-year period. *Med Mycol*. 2018;56(8):963–971.
- [40] Casadevall A, Freij JB, Hann-Soden C, et al. Continental drift and speciation of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes. *mSphere*. 2017;2:pii: e00103-17.
- [41] Herkert PF, Hagen F, de Oliveira Salvador GL, et al. Molecular characterisation and antifungal susceptibility of clinical *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII) isolates from Southern Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35:1803–1810.
- [42] Wiesner DL, Moskalenko O, Corcoran JM, et al. Cryptococcal genotype influences immunologic response and human clinical outcome after meningitis. *MBio*. 2012;3:pii: e00196-12.
- [43] Day JN, Qihui S, Thanh LT, et al. Comparative genomics of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* associated with meningitis in HIV infected and uninfected patients in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:e0005628.
- [44] Tarai B, Tarai B, Kher V, et al. Early onset primary pulmonary cryptococcosis in a renal transplant patient. *Indian J Med Microbiol*. 2010;28:250–252.
- [45] Trpkovic A, Pekmezovic M, Barac A, et al. In vitro antifungal activities of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole and itraconazole against *Cryptococcus neoformans* isolated from cerebrospinal fluid and blood from patients in Serbia. *J Mycol Med*. 2012;22:243–248.
- [46] Trilles L, Meyer W, Wanke B, et al. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex. *Med Mycol*. 2012;50:328–332.
- [47] Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Mora DJ, et al. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol*. 2013;51:635–640.
- [48] Lockhart SR, Iqbal N, Bolden CB, et al. Epidemiologic cutoff values for triazole drugs in *Cryptococcus gattii*: correlation of molecular type and in vitro susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73:144–148.
- [49] Dannaoui E, Abdul M, Arpin M, et al. Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:2464–2470.
- [50] Van Wyk M, Govender NP, Mitchell TG, et al. Multilocus sequence typing of serially collected isolates of cryptococcus from HIV-infected patients in South Africa. *J Clin Microbiol*. 2014;52:1921–1931.
- [51] Rossi SA, Trevijano-Contador N, Scorzoni L, et al. Impact of resistance to fluconazole on virulence and morphological aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates. *Front Microbiol*. 2016;7:153.
- [52] Aller AI, Martin-Mazuelos E, Lozano F, et al. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:1544–1548.
- [53] Bicanic T, Harrison T, Niepieklo A, et al. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis

- after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. *Clin Infect Dis.* 2006;43:1069–1073.
- [54] Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Launay O, et al. Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: The CryptoA/D study. *PLoS Med.* 2007;4:e21.
- [55] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33:1870–1874.
- [56] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725–2729.
- [57] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009;25:1451–1452.
- [58] Tanaka R, Taguchi H, Takeo K, et al. Determination of ploidy in *Cryptococcus neoformans* by flow cytometry. *J Med Vet Mycol.* 1996;34:299–301.
- [59] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – 3rd ed. CLSI document M27-A3. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. ISBN 1-56238-666-2.
- [60] Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:5898–5906.

## **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

#### 4.1 Etapa 1: Incidência e impacto clínico da criptococose em transplante renal

- O presente estudo relata a maior casuística de criptococose em pacientes submetidos a transplante renal de um único centro, com prevalência de 0,8% e incidência de 8,4 por 1.000 transplantes renais documentadas ao longo do período de 13 anos de observação.
- Nesta série, observou-se que 76,6% dos casos de criptococose ocorreram após um ano do transplante, com uma mediana de 42 meses. Este achado pode estar relacionado à exposição tardia ao fungo, mudança da intensidade de imunossupressão meses antes da doença ou efeito modulador do uso de inibidores de calcineurina no período precoce após o transplante.
- O comprometimento do SNC foi o mais encontrado, com taxa de 74,5% dos casos. Formas graves como disseminação (42,6%) foram identificadas numa relevante proporção de pacientes.
- A criptococose exerce um impacto sobre a função do enxerto, sendo esse efeito mais acentuado nos pacientes que utilizaram AMB. A terapia antifúngica primária consistiu em AMB desoxicolato em 87% dos casos. Em 46,2% dos pacientes tratados com AMB houve elevação da creatinina maior que 50% e uma porcentagem substancial dos pacientes (18,2%) evoluiu com perda do enxerto. A sobrevida do enxerto foi significativamente menor em pacientes tratados com AMB desoxicolato associados a uma condição adicional de injúria renal ( $P = 0,02$ ).
- SIRI foi descrita em três casos (6,4%) e sem correlação com disfunção do enxerto.
- Nossos dados colaboram na recomendação de evitar AMB desoxicolato nessa população, particularmente nos pacientes com disfunção renal na admissão ou expostos a outra condição de injúria renal. Recomenda-se uso de formulações lipídicas de AMB nos casos graves, com disseminação ou comprometimento do SNC e fluconazol nas formas leves a moderadas extraneurais da criptococose.

- Observou-se taxa de mortalidade em 90 dias de 28,9%. A redução da nefrotoxicidade poderia se correlacionar com um benefício substancial na sobrevivência desses pacientes.

#### 4.2 Etapa 2: Diversidade genotípica e sua relevância clínica

- Esse artigo é o maior estudo de caracterização genotípica dos isolados de complexo *C. neoformans/C. gattii* em pacientes submetidos a transplante renal.
- O complexo *C. neoformans* foi a espécie mais frequentemente isolada, respondendo por 88% dos episódios. Por outro lado, vale realçar que se identificou um universo de 10 pacientes submetidos a transplante renal (12%) que foram infectados por isolados do complexo *C. gattii*.
- A prevalência de infecções causadas por agentes do complexo *C. gattii* foi significativamente maior entre aqueles submetidos à retransplante ( $P = 0,046$ ). Este achado pode estar relacionado à maior possibilidade de ocorrência de infecção primária (em contraste a reativação) nesta população.
- Agentes do complexo *C. gattii* apresentaram valores de CIMs para fluconazol  $\geq 16 \text{ mg l}^{-1}$  em maior proporção quando comparados aos isolados de *C. neoformans* ( $P = 0,008$ ). Esse achado confirma a relevância clínica da identificação das espécies de *Cryptococcus*.
- O genótipo mais comumente identificado nos pacientes foi o VNI (66,7%). É intrigante o fato de terem sido identificados quatro casos de infecção envolvendo o genótipo VNB, agente este raramente identificado fora da África. Vale ressaltar que foram encontrados dois casos de infecção mista envolvendo genótipos diferentes e um caso de infecção pelo genótipo híbrido VNI/VNII.
- Pacientes infectados por isolados não identificados como genótipo VNI apresentaram significativamente mais comprometimento cutâneo que os infectados por VNI ( $P = 0,012$ ).
- A taxa de mortalidade em 90 dias foi de 45%. A diferença da mortalidade das duas publicações pode ser explicada pelo fato de somente terem sido incluídos casos com culturas positivas na segunda publicação.

- A grande maioria dos médicos modifica a imunossupressão nas formas moderadas e graves de criptococose (78,6%).
- Na análise de mortalidade com 30 dias, os fatores prognósticos identificados na análise multivariada foram fungemia e ausência de cefaleia. Esses fatores condizem com alta carga fúngica e diagnóstico tardio.
- Apesar das limitações de um estudo retrospectivo com casuística significativa, mas ainda insuficiente para permitir análise multivariada de fatores de risco, os dados desse estudo mostram que a criptococose se mantém como uma complicação crucial nos pacientes submetidos a transplante renal.
- Poucas características clínicas e impacto no desfecho foram documentados em relação aos diferentes genótipos. Apesar de o nosso estudo ter poder limitado para detectar diferenças, ele reforça a hipótese de que virulência não é consistentemente associada a um genótipo específico e deve estar correlacionada a propriedades individuais dos isolados e da complexa interação entre o agente e o hospedeiro.

## **5. APÊNDICE**

---



## Apêndice 1: Ficha clínica padrão.

## Ficha Clínica: Criptococose e Tx Renal (casos)

Nº \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ RH/Pasta: \_\_\_\_\_  
 DN / / Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: M ( ) F ( ) Raça: ( ) branca ( ) parda ( ) negra ( ) amarela  
 Natural: \_\_\_\_\_ Procedência: \_\_\_\_\_  
 Profissão: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_-\_\_\_\_\_  
 Escolaridade: ( ) analfabeto ( ) 1-4ª ( ) 5-8ª ( ) Colegial ( ) Superior -> ( ) Incompleto ( ) Completo  
 Contato com região rural: ( ) não ( ) sim ( ) NA  
 Exposição ao fungo: ( ) sim ( ) não ( ) NA  
 Tipo de Exposição: Pássaros de Cativeiro ( ) Pombas ( ) Galinheiro ( ) Eucaliptos ( )

**DADOS DO TRANSPLANTE**

Tx atual em: / /  
 Rim Doador Vivo ( ) : HLA I ( ) II ( ) III ( ) Doador: \_\_\_\_\_  
 Doador Cadáver ( )  
 Etiologia da IRC: \_\_\_\_\_  
 Diálise Prévia - Tipo: ( ) HD ( ) DP Período (em meses): \_\_\_\_\_

**Intercorrências pós-tx:**

CMV: ( ) sim ( ) não

1) Data: / / ( ) I. ativa assintomática ( ) Sdr viral ( ) Dça Invasiva ( ) I. c/ quadro clínico incompleto

2) Data: / / ( ) I. ativa assintomática ( ) Sdr viral ( ) Dça Invasiva ( ) I. c/ quadro clínico incompleto

TB ( ) não ( ) sim: Comprometimento: \_\_\_\_\_ Data: / /

Rejeição ( ) sim ( ) não ( ) NA

1) Data / / ( ) Aguda ( ) Crônica Tratado? ( ) sim ( ) não ( ) NA Bx: \_\_\_\_\_

2) Data / / ( ) Aguda ( ) Crônica Tratado? ( ) sim ( ) não ( ) NA Bx: \_\_\_\_\_

3) Data / / ( ) Aguda ( ) Crônica Tratado? ( ) sim ( ) não ( ) NA Bx: \_\_\_\_\_

**Comorbidades**

1) DM ( ) sim ( ) não ( ) NA

2) HAS ( ) sim ( ) não ( ) NA

3) Hepatite B ( ) sim ( ) não ( ) NA

4) Hepatite C ( ) sim ( ) não ( ) NA

5) Hepatite Crônica ( ) sim ( ) não ( ) NA

6) Hiperuricemia/Gota ( ) sim ( ) não ( ) NA

7) Outras ( ) sim ( ) não ( ) NA Quais: \_\_\_\_\_

**Imunosupressão pré-diagnóstica** (incluir indução, basal e tratamento da rejeição):

Drogas	Doses/Períodos	Indicação

Retransplante: ( ) não ( ) sim Data: / / Duração: \_\_\_\_\_ Data da Perda: / /

Uso de Antifúngico prévio: ( ) não ( ) sim Data: / / Qual: \_\_\_\_\_ Motivo: \_\_\_\_\_  
 Data: / / Qual: \_\_\_\_\_ Motivo: \_\_\_\_\_

**DIAGNÓSTICO**

Período Pós-Tx: \_\_\_\_\_ Data / / Por Onde: \_\_\_\_\_

Data Internação: / / Data Da Alta: / / Duração da Internação: \_\_\_\_\_

1) Febre ( ) sim ( ) não ( ) NA

Duração Sintomas Gerais: \_\_\_\_\_

**2) Comprometimento do SNC**

( ) Comprovado ( ) Provável ( ) Não ( ) NA Duração sintomas: \_\_\_\_\_

a) Cefaléia ( ) sim ( ) não ( ) NA Intensidade: ( ) leve ( ) moderada ( ) intratável ( ) NA

b) Náuseas ( ) sim ( ) não ( ) NA c) Vômitos ( ) sim ( ) não ( ) NA

d) Alt. Estado Mental:

Confusão Mental ( ) sim ( ) não ( ) NA Sonolência ( ) sim ( ) não ( ) NA

Alt. Memória ( ) sim ( ) não ( ) NA Coma ( ) sim ( ) não ( ) NA

e) Alt. Visuais:

Fotofobia ( ) sim ( ) não ( ) NA      Diplopia ( ) sim ( ) não ( ) NA  
Embaçamento ( ) sim ( ) não ( ) NA      Papiledema ( ) sim ( ) não ( ) NA

f) Sinais Meníngeos ( ) sim ( ) não ( ) NA

g) Sinais Localizatórios      Convulsão ( ) sim ( ) não ( ) NA  
Alt. Pares Cranianos ( ) sim ( ) não ( ) NA      Déficit Motor ( ) sim ( ) não ( ) NA

h) Escala de Glasgow: ( ) sim ( ) não ( ) NA Valor: \_\_\_\_\_

i) Outros ( ) sim ( ) não ( ) NA Quais: \_\_\_\_\_

j) CT/RM de crânio ( ) sim ( ) não ( ) NA ( ) Normal Data / /

Dilatação Ventricular ( ) sim ( ) não ( ) NA      Edema Cerebral ( ) sim ( ) não ( ) NA

Realce Meníngeo ( ) sim ( ) não ( ) NA

Lesão Expansiva ( ) sim ( ) não ( ) NA ( ) única ( ) múltipla  
( ) hipodensa ( ) hiperdensa ( ) NA  
( ) c/ realce ( ) s/ realce ( ) NA

l) Bx Cerebral ( ) sim ( ) não ( ) NA Data / /

Resultado: \_\_\_\_\_

### 3) Comprometimento Pulmonar

( ) Comprovado ( ) Provável ( ) não ( ) NA Duração sintomas: \_\_\_\_\_

a) Tosse ( ) sim ( ) não ( ) NA      b) Expectoração ( ) sim ( ) não ( ) NA

c) Dispneia ( ) sim ( ) não ( ) NA FR: \_\_\_\_\_      d) Dor Pleural ( ) sim ( ) não ( ) NA

e) IR ( ) sim ( ) não ( ) NA IOT: Data / /

f) Outros ( ) Quais: \_\_\_\_\_

g) Rx Tórax ( ) nodular ( ) tumoral ( ) intersticial ( ) pneumônico ( ) cavitário ( ) nl ( ) DP ( ) NA

h) L. Pleural ( ) sim ( ) não ( ) NA Características: \_\_\_\_\_

i) CT de Tórax ( ) sim ( ) não ( ) NA Data / /

( ) nodular ( ) intersticial ( ) pneumônico ( ) cavitário ( ) nl ( ) DP

j) Bx Pulmonar ( ) sim ( ) não ( ) NA Data / /

Resultado: \_\_\_\_\_

k) Cultura LBA ou Bx : ( ) positiva ( ) negativa ( ) NA Material: \_\_\_\_\_ Data / /

### 4) Comprometimento Cutâneo

( ) Comprovado ( ) Provável ( ) não ( ) NA Duração sintomas: \_\_\_\_\_

a) Dor ( ) sim ( ) não ( ) NA

b) Tipo de Lesão: ( ) nódulo ( ) celulite ( ) úlcera ( ) pápulas ( ) vesículas ( ) granuloma  
( ) tumoral ( ) fistulosa ( ) NA

c) Nº lesões: \_\_\_\_\_      d) Local das Lesões: \_\_\_\_\_

f) Bx Cutânea ( ) sim ( ) não ( ) NA Data / /

Resultado: \_\_\_\_\_

g) Cultura: ( ) positiva ( ) negativa ( ) NA Material: \_\_\_\_\_ Data / /

### 5) Outro Comprometimento

( ) Comprovado ( ) Provável ( ) não ( ) NA Duração sintomas: \_\_\_\_\_

a) Órgão Acometido: \_\_\_\_\_

b) Manifestações Clínicas: \_\_\_\_\_

c) Critério Diagnóstico:

( ) Clínico: \_\_\_\_\_  
( ) Radiológico Data / / Descrição: \_\_\_\_\_  
( ) Histopatológico Data / / Descrição: \_\_\_\_\_  
( ) Microbiológico Data / / Descrição: \_\_\_\_\_

6) Fungemia ( ) sim ( ) não ( ) NA Data / /

7) Infecção Disseminada: ( ) sim ( ) não ( ) NA

**TRATAMENTO ANTIFÚNGICO**

Peso: \_\_\_\_\_ Kg

Droga	Dose	Período	Modificado	Causa

Realizou Terapia Combinada? ( ) não ( ) sim Qual associação: \_\_\_\_\_

**MANUSEIO DA IMUNOSUPRESSÃO**

Imunossupressão no dia do diagnóstico: \_\_\_\_\_

Modificado após o diagnóstico: ( ) sim ( ) não ( ) NA

Modificação:

	Tipo Modificação	Data	Motivo
1			
2			
3			
4			

**EVOLUÇÃO****1) Evolução Látex Sanguíneo**

	Basal	±2s	±10s						
Data									
Látex Sg									
TTO									

**2) Evolução do LCR**

	Basal	±2s	±10s						
Data									
PI/PF									
Células									
N/E									
L/M									
Proteína									
Glicose									
T. China									
Látex									
Cultura									
TTO									

Apresentou HIC? ( ) Sim ( ) Não ( ) NA

Tratamento da HIC: ( ) NA ( ) Tratamento conservador ( ) Punção seriada ( ) Derivação

( ) Corticóide ( ) Manitol

**3) Evolução do Enxerto**

	Basal	Admiss.	D1 Anfo	Alt. 50%	Pico	Alta	6m	1a	1,5a	2a
Data										
Creatinina										
TTO										
	Basal	Admiss.	D1 Anfo	< 3,6	< 3.0	Alta				
Data										
K										
TTO										

**Biópsia do Enxerto** ( ) sim ( ) não ( ) NA Data / / Resultado: \_\_\_\_\_

**Disfunção do Enxerto** ( ) não ( ) NA ( ) sim

Relação com Anfotericina: ( ) Definitivamente Relacionada ( ) Associada ( ) Não Relacionada

Outra Causa: ( ) Rejeição ( ) NA ( ) Imunosupressão Qual: \_\_\_\_\_

( ) Sepse ( ) Pielonefrite ( ) Outro Qual: \_\_\_\_\_

Intensidade: ( ) Leve ( ) Moderada ( ) Grave

Repercussão: ( ) Nada ( ) Medidas Gerais ( ) Suspensão ( ) Substituição Formulações lipídicas

( ) Hemodiálise - Data da 1ª Diálise / / ( ) NA

( ) Perda do Enxerto - Data da Enxertectomia / /

Evolução da Disfunção: ( ) recuperou ( ) NA

Hipocalcemia por Anfo B? ( ) sim ( ) não ( ) NA

Necessitou reposição de K? ( ) sim ( ) não ( ) NA

**4) Evolução Radiológica**

a) CT/RM crânio

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Normal ( ) Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( ) Sequelar

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Normal ( ) Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( ) Sequelar

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Normal ( ) Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( ) Sequelar

b) Rx de Tórax

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Normal ( ) Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( ) Sequelar

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Normal ( ) Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( ) Sequelar

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Normal ( ) Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( ) Sequelar

c) CT de Tórax

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Normal ( ) Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( ) Sequelar

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Normal ( ) Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( ) Sequelar

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Normal ( ) Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( ) Sequelar

d) Outro: \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Normal ( ) Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( ) Sequelar

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Normal ( ) Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( ) Sequelar

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ( ) Normal ( ) Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( ) Sequelar

**AValiação Resposta e Desfecho****1) Com 2 semanas de tratamento**

A- Resposta Clínica: ( ) Favorável ( ) Inalterada ( ) Desfavorável

B- Resposta Microbiológica: ( ) Erradicação ( ) Erradicação Presumida ( ) Persistência

C- Resposta Global: ( ) cura ( ) melhora ( ) falência ( ) óbito

**2) Com 10 semanas de tratamento**

A- Resposta Clínica: ( ) Favorável ( ) Inalterada ( ) Desfavorável

B- Resposta Microbiológica: ( ) Erradicação ( ) Erradicação Presumida ( ) Persistência

C- Resposta Global: ( ) cura ( ) melhora ( ) falência ( ) óbito

**3) Com 6 meses após tratamento**

A- Resposta Clínica: ( ) Favorável ( ) Inalterada ( ) Desfavorável

B- Resposta Microbiológica: ( ) Erradicação ( ) Erradicação Presumida ( ) Persistência

C- Resposta Global: ( ) cura ( ) melhora ( ) falência ( ) óbito

**4) Ao Término do Tratamento**

A- Resposta Clínica: ( ) Favorável ( ) Inalterada ( ) Desfavorável

B- Resposta Microbiológica: ( ) Erradicação ( ) Erradicação Presumida ( ) Persistência

C- Resposta Global: ( ) cura ( ) melhora ( ) falência ( ) óbito

**5) Dados do Óbito:** Data: / / ( ) Precoce ( ) Tardio

Relação com a infecção: ( ) Atribuída ( ) Associada ( ) Não Relacionada

Qual é a outra causa? \_\_\_\_\_

Necropsia: ( ) não ( ) NA ( ) sim Resultado: \_\_\_\_\_

**6) Infecções Concomitantes:**

Data / / Qual: \_\_\_\_\_

Data / / Qual: \_\_\_\_\_

Data / / Qual: \_\_\_\_\_

Data / / Qual: \_\_\_\_\_

Data / / Qual: \_\_\_\_\_

Data / / Qual: \_\_\_\_\_

**ACOMPANHAMENTO APÓS A INFECÇÃO****1) Recidiva:** não ( ) NA ( ) sim ( ) Quantas: \_\_\_\_\_ Data(s) / /

Comprometimento(s): \_\_\_\_\_

Antifúngico Utilizado/Dose/Duração: \_\_\_\_\_

Desfecho: ( ) cura ( ) melhora ( ) falência ( ) óbito Data: / /

**2) Sequela** não ( ) NA ( ) sim ( ) Qual: \_\_\_\_\_**3) Avaliação após a Infecção:**➤ **6 meses:** ( ) Óbito ( ) Perda do Enxerto Cr: \_\_\_\_\_➤ **1 ano:** ( ) Óbito ( ) Perda do Enxerto Cr: \_\_\_\_\_➤ **1 ano e 6 meses:** ( ) Óbito ( ) Perda do Enxerto Cr: \_\_\_\_\_➤ **2 anos:** ( ) Óbito ( ) Perda do Enxerto Cr: \_\_\_\_\_**SITUAÇÃO ATUAL**

Data da Última Avaliação: / /

**Perda do Enxerto:** ( ) sim ( ) não

Motivo da Perda do Enxerto: \_\_\_\_\_

Data da 1ª Diálise: / / Data da Enxertectomia: / /

**Retransplante:** ( ) sim ( ) NA ( ) não Data / / Evolução: \_\_\_\_\_( ) **Vivo** quanto tempo após a infecção: \_\_\_\_\_( ) **Óbito** ( ) não ( ) NA ( ) sim Data / /

Causa: \_\_\_\_\_

Necropsia: ( ) não ( ) NA ( ) sim Resultado: \_\_\_\_\_

( ) **NA**

**Apêndice 2: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – UNIFESP.****COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**São Paulo, 02 de novembro de 2013  
CEUA N 318847Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a): Vinicius Ponzio Da Silva  
Depto/Disc: Infectologia  
Arnaldo Lopes Colombo (orientador)Título do projeto: "Avaliação da virulência de cepas clínicas do complexo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* utilizando o peixe zebra como modelo experimental".**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP**

Criptococose é uma micose profunda que acomete pacientes imunossuprimidos e imunocompetentes, apresentando alta mortalidade. Na atualidade, pacientes submetidos a transplante de rim compreendem o grupo de pacientes com maior risco para desenvolver essa infecção. O projeto tem como objetivos: 1) Caracterizar, genotipicamente, as cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isoladas de episódios de micoses invasivas documentadas em pacientes submetidos a transplante renal. 2) Padronizar o peixe zebra como modelo de estudo para infecção pelo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. 3) Descrever e comparar a virulência das cepas clínicas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* em modelo experimental de criptococose em peixe zebra. 4) Avaliar o padrão de resposta do peixe zebra a diferentes genótipos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Como metodologia, será realizada identificação convencional e molecular pela metodologia MLST das cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* isoladas em pacientes submetidos a transplante renal na UNIFESP de 1995 a 2013. Após isso, o modelo experimental de peixe zebra será padronizado para o agente infeccioso e cepas dos pacientes serão inoculadas em peixe zebra para analisar a curva de mortalidade, padrão de resposta inflamatória e quantificação da carga fúngica.

ANIMAIS: Serão utilizados:  
- 730 peixes zebra, fêmea, com 5 dias de idade  
PROCEDÊNCIA: Duke University  
MANUTENÇÃO: Duke University

VIGÊNCIA DO ESTUDO: início previsto para: 09/2013 com término previsto para: 09/2015

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 26/09/2013, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

### Apêndice 3: Carta de aprovação do artigo 2 no periódico “Emerging Microbes & Infection”.

17/01/2019

ScholarOne Manuscripts

#### Emerging Microbes & Infections

**Decision Letter (TEMI-2018-0044)****From:** Shan.Lu@umassmed.edu**To:** arnaldolcolombo@gmail.com, viponzio@gmail.com**CC:****Subject:** Emerging Microbes & Infections - Decision on Manuscript ID TEMI-2018-0044**Body:** 19-Dec-2018

Dear Professor Colombo:

Ref: Genotypic diversity and clinical outcome of cryptococcosis in renal transplant recipients in Brazil

Our reviewers have now considered your paper and have recommended publication in Emerging Microbes & Infections. We are pleased to accept your paper in its current form which will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

The publisher also requests that proofs are checked through the publisher's tracking system and returned within 48 hours of receipt.

Taylor & Francis strives to be compliant with the open access (OA) policies of the major national and international funding bodies. Information about funder compliance and OA policies can be found on our Author Services website. Details of our Green OA policy, including deposit in institutional and subject repositories, can be found on the Sharing your work (<http://authorservices.taylorandfrancis.com/sharing-your-work/>) page. We recommend that you retain your Accepted Manuscript for this purpose.

For more information regarding the versions of your article that can be used to meet Green OA requirements, and the embargo period that applies, please see the open access journal finder (<http://authorservices.taylorandfrancis.com/journal-list/>) page.

Thank you for your contribution to Emerging Microbes & Infections and we look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,

Shan Lu  
Editor in Chief  
Emerging Microbes & Infections

/.

**Date Sent:** 19-Dec-2018

# Apêndice 4: Supplementary Table 1 do Artigo 2.

Page 47 of 47

Emerging Microbes & Infections

Isolate Name (IC-Opt Bank)	Other Name (Hess/LMI Bank)	Date of Isolation	Source	Origin	Patient Status of Birth	Reference	Species name	Molecular Type	Phylo	Mating-type	Haplotype	URAC-GT-SeqW
L111	V1	13/1/87	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L37	V2	03/05/95	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H10	13
L53	V4 / 845A	15/01/98	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H11	58
L54	V5 / 845A	21/01/98	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Minas Gerais	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H11	58
L57	V6	16/02/98	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L177	V7 / 898	06/11/98	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H12	2
L178	V8 / 852	25/11/98	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H12	2
L184	V9 / 1114	23/04/99	Saliva	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L188	V10 / 1199	12/06/99	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. gallii	VGI		MAT a	H13	2
L195	V11 / 1194	08/07/99	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. gallii	VGI		MAT a	H13	2
L224	V12 / 1745B	18/08/00	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H14	2
L269	V14 / 5400	25/08/03	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H15	4
L290	V15 / 6886	12/06/03	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H15	4
L315	V16 / 8323	01/06/04	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Paraná	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H15	4
L331	V17 / 9220	24/03/05	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H16	26
L334	V18 / 9273	11/04/05	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H16	26
L333	V19 / 9272	10/04/05	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H17	1
L338	V20 / 9268	14/04/05	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H17	1
L342	V22 / 10131	27/12/05	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Rio de Janeiro	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L347	V23 / 10287	17/11/05	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Rio de Janeiro	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L343	V24 / 10211	20/11/05	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L345	V25 / 10264	20/11/05	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L348	V26 / 10335	14/12/05	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L350	V27 / 10370	18/12/05	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H17	1
L351	V28 / 10398	27/12/05	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L353	V29 / 11028	10/01/06	Urine	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L355	V30 / 84	24/01/06	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L354	V31 / 85	09/01/06	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H18	13
L363	V32 / 788	11/06/06	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Marão Grosso	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H15	4
L364	V33 / 975	28/07/06	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L368	V37 / 1228	04/10/06	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H14	2
L373	V39 / 1440	18/11/06	Saliva	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. gallii	VGI		MAT alpha	H20	2
L377	V40 / 1600	07/01/07	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H21	1
L378	V41 / 1638	22/01/07	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H15	4
L379	V43 / 1647	26/01/07	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H17	4
L381	V44 / 1738	17/02/07	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Rio de Janeiro	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H15	4
L411	V47 / 2781	17/12/07	Saliva	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H15	4
L420	V48 / 2918	12/02/08	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H15	4
L434	V52 / 3247	26/05/08	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H22	4
L438	V53 / 4078A-09	22/02/09	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H23	3
L441	V54 / 4052-09	23/02/09	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H23	3
L446	V58 / 5381-09	18/06/09	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L447	V60 / 5385-09	25/06/09	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L448	V61 / 5475-09	07/07/09	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Pará	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H24	1
L449	V62 / 5484-09	18/08/09	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Pará	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H2	4
L450	V63 / 5476-09	27/07/09	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L452	V66 / 6124-09	09/12/09	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H25	2
L453	V67 / 6307-10	17/12/09	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT a	H9	1
L454	V68 / 6386-10	03/03/10	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Ceará	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L455	V69 / 6396-10	03/03/10	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Paraná	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H26	1
L456	V70 / 6396-10	04/03/10	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Paraná	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H26	1
L458	V71 / 6606-10	16/05/10	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H14	2
L459	V72 / 6818-10	22/05/10	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H14	2
L460	V73 / 6905-13	31/05/10	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H27	1
L463	V78 / 6196-10	07/06/10	Saliva	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H2	4
L464	V77 / 13338-11	30/12/10	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Minas Gerais	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H19	4
L479	V81 / 6316-11	03/11/11	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L481	V82 / 6461-12	28/11/11	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Paraná	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L483	V83 / 6386-12	13/12/11	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H17	1
L484	V84 / 6407-11	13/12/11	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H17	1
L485	V85 / 6608-13	25/12/11	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L486	V88 / 8427B-12	05/01/12	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L491	V98 / 8607-12	08/02/12	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H28	2
L508	V99 / 8971-12	30/07/12	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Sergipe	Presente Report	C. gallii	VGI		MAT alpha	H28	3
L509	V96 / 8903B-12	30/07/12	Lung	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Sergipe	Presente Report	C. gallii	VGI		MAT alpha	H28	3
L512	V97 / 8955-12	03/09/12	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Pernambuco	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H28	1
L513	V98 / 8608-13	26/08/12	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H14	2
L522	V105 / 8270A-13	02/03/13	Lung	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Alagoas	Presente Report	C. gallii	VGI		MAT alpha	H26	6
L533	V108 / 8270B-13	04/03/13	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Alagoas	Presente Report	C. gallii	VGI		MAT alpha	H26	6
L567	V107 / 8495-13	18/04/13	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L576	V110 / 8554-13	06/05/13	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H26	2
L580	V111 / 8540-13	14/05/13	Lung	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H17	1
L581	V112 / 8493-13	16/05/13	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. gallii	VGI		MAT a	H31	30
L582	V113 / 8494-13	23/05/13	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. gallii	VGI		MAT a	H31	30
L589	V114 / 8498-13	25/06/13	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Bahia	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H14	2
L601	V115 / 8563-13	18/07/13	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	not available	not available
L614	V118 / 8978-13	17/09/13	Lung	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI	Diploid	MAT alpha	H9	1
L615	V119 / 8578-13	21/09/13	Lung	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H9	1
L616	V120 / 8580-13	22/09/13	Blood	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	São Paulo	Presente Report	C. gallii	VGI		MAT alpha	H28	3
L619	V122 / 8582-13	14/10/13	CSF	Kidney transplant patient, São Paulo-Brazil	Ceará	Presente Report	C. neoformans	VNI		MAT alpha	H28	1

URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/temi> E-mail: [TEMI-peerreview@journals.tandf.co.uk](mailto:TEMI-peerreview@journals.tandf.co.uk)



	UPA-WCB Genomes Accession Number	LAC1-07 ISHAM	LAC1-WCB Genomes Accession Number	D021-07 ISHAM	D021-WCB Genomes Accession Number	D21-07 ISHAM	D01-WCB Genomes Accession Number	CAP10-07 ISHAM	CAP10-WCB Genomes Accession Number	FLB1-07 ISHAM	FLB1-WCB Genomes Accession Number	T071-WCB Genomes Accession Number	QD1-07 ISHAM	Sequente Type-ISHAM	90-days Survival	Disseminated infection	Fungemia	FCZ MIC
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		
8																		
9																		
10																		
11																		
12																		
13																		
14																		
15																		
16																		
17																		
18																		
19																		
20																		
21																		
22																		
23																		
24																		
25																		
26																		
27																		
28																		
29																		
30																		
31																		
32																		
33																		
34																		
35																		
36																		
37																		
38																		
39																		
40																		
41																		
42																		
43																		
44																		
45																		
46																		

URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/temi> E-mail: [TEMI-peerreview@journals.tandf.co.uk](mailto:TEMI-peerreview@journals.tandf.co.uk)

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

1. Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Levitz SM. A chronological history of the International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis (ICCC), an invaluable forum for growth of the cryptococcal research field and clinical practice. *Mycopathologia*. 2012;173(5-6):287-93.
2. Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(1):179-206.
3. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Wickes BL, Fell JW. Systematics of the Genus *Cryptococcus* and Its Type Species *C. neoformans*. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JP, Casadevall A, editors. *Cryptococcus* from Human Pathogen to Model Yeast. 1st ed. Washington (DC): ASM press; 2011. p. 3-15.
4. Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(10):753-64.
5. Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2006;20(3):507-44.
6. Kwon-Chung J, Bennett JE. Cryptococcosis. In: Kwon-Chung J, Bennett JE editors. *Medical Mycology*. 1st ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992. p.397-446.
7. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. 1st ed. Washinton (DC): American Society for Microbiology Press; 1998. 530 p.
8. Min KH, Kwon-Chung KJ. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg*. 1986;261(4):471-80.
9. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol*. 1982;15(3):535-7.
10. Klein KR, Hall L, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfel SL, Wengenack NL. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3669-72.
11. Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res*. 2006;6(4):574-87.

12. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, et al. The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere*. 2017;2(1) pii: e00357-16..
13. Kavanaugh LA, Fraser JA, Dietrich FS. Recent evolution of the human pathogen *Cryptococcus neoformans* by intervarietal transfer of a 14-gene fragment. *Mol Biol Evol*. 2006;23(10):1879-90.
14. Hagen F, Lumbsch HT, Arsic Arsenijevic V, Badali H, Bertout S, Billmyre RB, et al. Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus. *mSphere*. 2017;2(4) pii: e00238-17.
15. Firacative C, Trilles L, Meyer W. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. *PloS One*. 2012;7(5):e37566.
16. Posteraro B, Vella A, Cogliati M, De Carolis E, Florio AR, Posteraro P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(7):2472-6.
17. Gago S, Zaragoza O, Cuesta I, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Buitrago MJ. High-resolution melting analysis for identification of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* complex. *J Clin Microbiol*. 2011;49(10):3663-6.
18. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol*. 2009:1-14.
19. Cuomo CA, Rhodes J, Desjardins CA. Advances in *Cryptococcus* genomics: insights into the evolution of pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(7):e170473.
20. Munoz M, Camargo M, Ramirez JD. Estimating the Intra-taxa Diversity, Population Genetic Structure, and Evolutionary Pathways of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Front Genet*. 2018;9:148.
21. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol* . 2015;78:16-48.

22. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica (Cairo). 2013;2013:675213.
23. Levitz SM. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. Rev Infect Dis. 1991;13(6):1163-9.
24. Littman ML, Borok R. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. Mycopathol Mycol Appl. 1968;35(3):329-45.
25. Lazera MS, Cavalcanti MA, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*-evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. Med Mycol. 1998;36(2):119-22.
26. Lazera MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. Med Mycol. 2000;38(5):379-83.
27. Marietto-Goncalves GA, Grandi F. Are all psittacine birds carriers of *Cryptococcus neoformans*? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(6):781.
28. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(49):17258-63.
29. Cogliati M, D'Amicis R, Zani A, Montagna MT, Caggiano G, De Giglio O, et al. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. FEMS Yeast Res. 2016;16(7) pii: fow086.
30. Polacheck I, Kwon-Chung KJ. Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillisporus*. J Bacteriol. 1980;142(1):15-20.
31. Springer DJ, Mohan R, Heitman J. Plants promote mating and dispersal of the human pathogenic fungus *Cryptococcus*. PloS One. 2017;12(2):e0171695.
32. Chang YC, Khanal Lamichhane A, Bradley J, Rodgers L, Ngamskulrungroj P, Kwon-Chung KJ. Differences between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in the Molecular Mechanisms Governing Utilization of D-Amino Acids as the Sole Nitrogen Source. PloS One. 2015;10(7):e0131865.
33. Cogliati M, Puccianti E, Montagna MT, De Donno A, Susever S, Ergin C, et al. Fundamental niche prediction of the pathogenic yeasts *Cryptococcus*

- neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Europe. Environ Microbiol. 2017;19(10):4318-25.
34. Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RC, et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. J Clin Microbiol. 2003;41(1):73-7.
  35. Takahara DT, Lazera Mdos S, Wanke B, Trilles L, Dutra V, Paula DA, et al. First report on *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of Cuiaba, State of Mato Grosso, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013;55(6):371-6.
  36. Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of Sao Paulo, Brazil. Med Mycol. 2000;38(5):385-90.
  37. Brito-Santos F, Barbosa GG, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B, Meyer W, et al. Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro basin. PLoS One. 2015;10(2):e0115866.
  38. Leite DP, Jr., Amadio JV, Martins ER, Simoes SA, Yamamoto AC, Leal-Santos FA, et al. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. J Occup Med Toxicol. 2012;7(1):11.
  39. Firacative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragozi MT, Castaneda E, Latin American Cryptococcal Study G. The status of cryptococcosis in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018;113(7):e170554.
  40. Rhodes J, Desjardins CA, Sykes SM, Beale MA, Vanhove M, Sakthikumar S, et al. Tracing Genetic Exchange and Biogeography of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* at the Global Population Level. Genetics. 2017;207(1):327-46.
  41. Hagen F, Ceresini PC, Polacheck I, Ma H, van Nieuwerburgh F, Gabaldon T, et al. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. PLoS One. 2013;8(8):e71148.
  42. Souto AC, Bonfietti LX, Ferreira-Paim K, Trilles L, Martins M, Ribeiro-Alves M, et al. Population Genetic Analysis Reveals a High Genetic Diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII Population and Shifts the Global Origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid Desert in the Northeast of Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(8):e0004885.

43. Engelthaler DM, Hicks ND, Gillece JD, Roe CC, Schupp JM, Driebe EM, et al. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal. *mBio*. 2014;5(4):e01464-14.
44. Herkert PF, Meis JF, Lucca de Oliveira Salvador G, Rodrigues Gomes R, Aparecida Vicente V, Dominguez Muro M, et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* sensu stricto from southern Brazil. *J Med Microbiol*. 2018;67(4):560-69.
45. Meyer W. G, , F., Ngamskulrungraj P., Trilles L., Hagen F., Casteñeda E., Boekhout T. . Molecular Typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* Species Complex. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ., Perfect JR, Casadevall A, editors. *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast. 1st ed. Washington (DC): American Society for Microbiology Press; 2011. p. 327-57.
46. Trilles L, Lazera Mdos S, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(5):455-62.
47. Martins LM, Wanke B, Lazera Mdos S, Trilles L, Barbosa GG, Macedo RC, et al. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(6):725-30.
48. Da Silva BK, Freire AK, Bentes Ados S, Sampaio Ide L, Santos LO, Dos Santos MS, et al. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. *Rev Iberoam Micol*. 2012;29(1):40-3.
49. Matos CS, de Souza Andrade A, Oliveira NS, Barros TF. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(7):1647-52.
50. Hasimoto e Souza LK, Costa CR, Fernandes Ode F, Abrao FY, Silva TC, Tremea CM, et al. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(3):343-7.

51. Favalessa OC, de Paula DA, Dutra V, Nakazato L, Tadano T, Lazera Mdos S, et al. Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. J Infect Dev Ctries. 2014;8(8):1037-43.
52. Reichert-Lima F, Busso-Lopes AF, Lyra L, Peron IH, Taguchi H, Mikami Y, et al. Evaluation of antifungal combination against *Cryptococcus* spp. Mycoses. 2016;59(9):585-93.
53. Damasceno-Escoura AH, de Souza ML, de Oliveira Nunes F, Pardi TC, Gazotto FC, Florentino DH, et al. Epidemiological, Clinical and Outcome Aspects of Patients with Cryptococcosis Caused by *Cryptococcus gattii* from a Non-endemic Area of Brazil. Mycopathologia. 2018.
54. Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. Genetics. 2006;172(4):2223-38.
55. Cogliati M, Prigitano A, Esposto MC, Romano L, Grancini A, Zani A, et al. Epidemiological trends of cryptococcosis in Italy: Molecular typing and susceptibility pattern of *Cryptococcus neoformans* isolates collected during a 20-year period. Med Mycol. 2018;56(8):963-71.
56. Barreto de Oliveira MT, Boekhout T, Theelen B, Hagen F, Baroni FA, Lazera MS, et al. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. J Clin Microbiol. 2004;42(3):1356-9.
57. Ngamskulrungron P, Gilgado F, Faganello J, Litvintseva AP, Leal AL, Tsui KM, et al. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. PloS One. 2009;4(6):e5862.
58. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Boekhout T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. Fungal Genet Biol. 2008;45(4):400-21.
59. Andrade-Silva LE, Ferreira-Paim K, Ferreira TB, Vilas-Boas A, Mora DJ, Manzato VM, et al. Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. PloS One. 2018;13(3):e0193237.
60. Dou HT, Xu YC, Wang HZ, Li TS. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in China between 2007 and 2013 using



- multilocus sequence typing and the DiversiLab system. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34(4):753-62.
61. Espinel-Ingroff A, Kidd SE. Current trends in the prevalence of *Cryptococcus gattii* in the United States and Canada. Infect Drug Resist. 2015;8:89-97.
62. Harris JR, Lockhart SR, Debess E, Marsden-Haug N, Goldoft M, Wohrle R, et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. Clin Infect Dis. 2011;53(12):1188-95.
63. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. Lancet Infect Dis. 2017;17(8):873-81.
64. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. Aids. 2009;23(4):525-30.
65. Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. Mycoses. 2016;59(3):145-50.
66. Sorrell TC, Chen SC, Ruma P, Meyer W, Pfeiffer TJ, Ellis DH, et al. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. J Clin Microbiol. 1996;34(5):1253-60.
67. Delgado AC, Taguchi H, Mikami Y, Myiajy M, Villares MC, Moretti ML. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. Mycopathologia. 2005;159(1):7-11.
68. Nosanchuk JD, Shoham S, Fries BC, Shapiro DS, Levitz SM, Casadevall A. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. Ann Intern Med. 2000;132(3):205-8.
69. May RC, Stone NR, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. Nat Rev Microbiol. 2016;14(2):106-17.
70. Ooi BS, Chen BT, Lim CH, Khoo OT, Chan DT. Survival of a patient transplanted with a kidney infected with *Cryptococcus neoformans*. Transplantation. 1971;11(4):428-9.

71. Beyt BE, Jr. Diagnosis of cryptococcal endophthalmitis. *Am J Clin Pathol*. 1984;81(2):272.
72. Kanj SS, Welty-Wolf K, Madden J, Tapson V, Baz MA, Davis RD, et al. Fungal infections in lung and heart-lung transplant recipients. Report of 9 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1996;75(3):142-56.
73. Baddley JW, Schain DC, Gupte AA, Lodhi SA, Kayler LK, Frade JP, et al. Transmission of *Cryptococcus neoformans* by Organ Transplantation. *Clin Infect Dis*. 2011;52(4):e94-8.
74. Hajjeh RA, Conn LA, Stephens DS, Baughman W, Hamill R, Graviss E, et al. Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons. Cryptococcal Active Surveillance Group. *J Infect Dis*. 1999;179(2):449-54.
75. Pappas PG, Perfect JR, Cloud GA, Larsen RA, Pankey GA, Lancaster DJ, et al. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clin Infect Dis*. 2001;33(5):690-9.
76. Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Laporte A. Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). French Cryptococcosis Study Group. *Clin Infect Dis*. 1996;23(1):82-90.
77. Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin Infect Dis*. 2000;31(2):499-508.
78. Dore GJ, Li Y, McDonald A, Kaldor JM. Spectrum of AIDS-defining illnesses in Australia, 1992 to 1998: influence of country/region of birth. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001;26(3):283-90.
79. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(4):515-48.
80. Hakim JG, Gangaidzo IT, Heyderman RS, Mielke J, Mushangi E, Taziwa A, et al. Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients. *Aids*. 2000;14(10):1401-7.
81. Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, Kleeberger C, Selnes OA, Miller EN, et al. HIV-associated neurologic disease incidence changes:: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998. *Neurology*. 2001;56(2):257-60.

82. Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Fink MC, Pannuti CS, Trujillo JR. Aids-related progressive multifocal leukoencephalopathy: a retrospective study in a referral center in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2008;50(4):209-12.
83. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;338(13):853-60.
84. Hung CC, Chang SC. Impact of highly active antiretroviral therapy on incidence and management of human immunodeficiency virus-related opportunistic infections. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(5):849-53.
85. Mirza SA, Phelan M, Rimland D, Graviss E, Hamill R, Brandt ME, et al. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clin Infect Dis*. 2003;36(6):789-94.
86. Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Fontanet A, Ronin O, Dupont B, Lortholary O. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. *Aids*. 2004;18(3):555-62.
87. Friedman GD, Jeffrey Fessel W, Udaltsova NV, Hurley LB. Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. *Mycoses*. 2005;48(2):122-5.
88. Bratton EW, El Hussein N, Chastain CA, Lee MS, Poole C, Sturmer T, et al. Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. *PloS One*. 2012;7(8):e43582.
89. Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Dauar RF, Boulware DR. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(3):353-62.
90. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Aids/DST [Internet]. Brasília: Unidade de Informação e Vigilância; 2005 Ano II No.:01 [cited 2018 Nov 2]. 42p. Available from: [file:///C:/Users/Vinicius/Downloads/boletim\\_epidemiologico\\_aids\\_e\\_dst\\_-\\_2005%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Vinicius/Downloads/boletim_epidemiologico_aids_e_dst_-_2005%20(1).pdf).
91. Tenforde MW, Mokomane M, Leeme T, Patel RKK, Lekwape N, Ramodimoosi C, et al. Advanced Human Immunodeficiency Virus Disease in Botswana

- Following Successful Antiretroviral Therapy Rollout: Incidence of and Temporal Trends in Cryptococcal Meningitis. *Clin Infect Dis*. 2017;65(5):779-86.
92. Patel RKK, Leeme T, Azzo C, Tlhako N, Tsholo K, Tawanana EO, et al. High Mortality in HIV-Associated Cryptococcal Meningitis Patients Treated With Amphotericin B-Based Therapy Under Routine Care Conditions in Africa. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5(11):ofy267.
93. Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Launay O, Lortholary O. Determinants of Disease Presentation and Outcome during Cryptococcosis: The CryptoA/D Study. *PLoS Med*. 2007;4(2):e21.
94. Davis JA, Horn DL, Marr KA, Fishman JA. Central nervous system involvement in cryptococcal infection in individuals after solid organ transplantation or with AIDS. *Transpl Infect Dis*. 2009;11(5):432-7.
95. George IA, Spec A, Powderly WG, Santos CAQ. Comparative Epidemiology and Outcomes of Human Immunodeficiency virus (HIV), Non-HIV Non-transplant, and Solid Organ Transplant Associated Cryptococcosis: A Population-Based Study. *Clin Infect Dis*. 2018;66(4):608-11.
96. Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with Cryptococcosis according to immune status. *PloS One*. 2013;8(3):e60431.
97. Rozenbaum R, Goncalves AJ. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. *Clin Infect Dis*. 1994;18(3):369-80.
98. Chen J, Varma A, Diaz MR, Litvintseva AP, Wollenberg KK, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(5):755-62.
99. Choi YH, Ngamskulrungraj P, Varma A, Sionov E, Hwang SM, Carriconde F, et al. Prevalence of the VNlc genotype of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV-associated cryptococcosis in the Republic of Korea. *FEMS Yeast Res*. 2010;10(6):769-78.
100. Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungraj P, Umeyama T, Takazono T, et al. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Med Mycol*. 2013;51(3):252-60.
101. Kwon-Chung KJ, Saijo T. Is *Cryptococcus gattii* a Primary Pathogen? *J Fungi (Basel)*. 2015;1(2):154-67.

102. Darze C, Lucena R, Gomes I, Melo A. The clinical laboratory characteristics of 104 cases of cryptococcal meningoencephalitis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000;33(1):21-6.
103. Correa Mdo P, Oliveira EC, Duarte RR, Pardal PP, Oliveira Fde M, Severo LC. Cryptococcosis in children in the State of Para, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32(5):505-8.
104. Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis.* 1995;21(1):28-34;5-6.
105. Antinori S, Galimberti L, Magni C, Casella A, Vago L, Mainini F, et al. *Cryptococcus neoformans* infection in a cohort of Italian AIDS patients: natural history, early prognostic parameters, and autopsy findings. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001;20(10):711-7.
106. Speed BR, Kaldor J, Cairns B, Pegorer M. Serum antibody response to active infection with *Cryptococcus neoformans* and its varieties in immunocompetent subjects. *J Med Vet Mycol.* 1996;34(3):187-93.
107. Williamson PR, Jarvis JN, Panackal AA, Fisher MC, Molloy SF, Loyse A, et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(1):13-24.
108. Antinori S. New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. *Isrn Aids.* 2013;2013:471363.
109. Nadrous HF, Antonios VS, Terrell CL, Ryu JH. Pulmonary cryptococcosis in nonimmunocompromised patients. *Chest.* 2003;124(6):2143-7.
110. Chang WC, Tzao C, Hsu HH, Lee SC, Huang KL, Tung HJ, et al. Pulmonary cryptococcosis: comparison of clinical and radiographic characteristics in immunocompetent and immunocompromised patients. *Chest.* 2006;129(2):333-40.
111. Singh N, Alexander BD, Lortholary O, Dromer F, Gupta KL, John GT, et al. Pulmonary cryptococcosis in solid organ transplant recipients: clinical relevance of serum cryptococcal antigen. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):e12-8.
112. Ngamskulrungroj P, Chang Y, Sionov E, Kwon-Chung KJ. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *mBio.* 2012;3(3) pii: e00103-12.

113. Phillips P, Galanis E, MacDougall L, Chong MY, Balshaw R, Cook VJ, et al. Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia. Clin Infect Dis. 2015;60(9):1368-76.
114. Krockenberger MB, Malik R, Ngamskulrungrroj P, Trilles L, Escandon P, Dowd S, et al. Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus gattii* infection: a rat model. Mycopathologia. 2010;170(5):315-30.
115. Christianson JC, Engber W, Andes D. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. Med Mycol. 2003;41(3):177-88.
116. Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. In: Mandell GL, Bennett Je, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005. P. 2997-3012.
117. Singh N, Dromer F, Perfect JR, Lortholary O. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients: current state of the science. Clin Infect Dis. 2008;47(10):1321-7.
118. Singh N, Rihs JD, Gayowski T, Yu VL. Cutaneous cryptococcosis mimicking bacterial cellulitis in a liver transplant recipient: case report and review in solid organ transplant recipients. Clin Transplant. 1994;8(4):365-8.
119. Murakawa GJ, Kerschmann R, Berger T. Cutaneous *Cryptococcus* infection and AIDS. Report of 12 cases and review of the literature. Arch Dermatol. 1996;132(5):545-8.
120. Neuville S, Dromer F, Morin O, Dupont B, Ronin O, Lortholary O. Primary cutaneous cryptococcosis: a distinct clinical entity. Clin Infect Dis. 2003;36(3):337-47.
121. Behrman RE, Masci JR, Nicholas P. Cryptococcal skeletal infections: case report and review. Rev Infect Dis. 1990;12(2):181-90.
122. Liu PY. Cryptococcal osteomyelitis: case report and review. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998;30(1):33-5.
123. Staib F, Seibold M, L'Age M. Persistence of *Cryptococcus neoformans* in seminal fluid and urine under itraconazole treatment. The urogenital tract (prostate) as a niche for *Cryptococcus neoformans*. Mycoses. 1990;33(7-8):369-73.
124. Larsen RA, Bozzette S, McCutchan JA, Chiu J, Leal MA, Richman DD. Persistent *Cryptococcus neoformans* infection of the prostate after successful

- treatment of meningitis. California Collaborative Treatment Group. *Ann Intern Med.* 1989;111(2):125-8.
125. Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2002;16(4):837-74.
  126. Sungkanuparph S, Filler SG, Chetchotisakd P, Pappas PG, Nolen TL, Manosuthi W, et al. Cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome after antiretroviral therapy in AIDS patients with cryptococcal meningitis: a prospective multicenter study. *Clin Infect Dis.* 2009;49(6):931-4.
  127. Skiest DJ, Hester LJ, Hardy RD. Cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome: report of four cases in three patients and review of the literature. *J Infect.* 2005;51(5):e289-97.
  128. Jenny-Avital ER, Abadi M. Immune reconstitution cryptococcosis after initiation of successful highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2002;35(12):e128-33.
  129. Shelburne SA, 3rd, Hamill RJ. The immune reconstitution inflammatory syndrome. *AIDS Rev.* 2003;5(2):67-79.
  130. Haddow LJ, Colebunders R, Meintjes G, Lawn SD, Elliott JH, Manabe YC, et al. Cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-1-infected individuals: proposed clinical case definitions. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(11):791-802.
  131. French MA. HIV/AIDS: immune reconstitution inflammatory syndrome: a reappraisal. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):101-7.
  132. Lortholary O, Fontanet A, Memain N, Martin A, Sitbon K, Dromer F, et al. Incidence and risk factors of immune reconstitution inflammatory syndrome complicating HIV-associated cryptococcosis in France. *Aids.* 2005;19(10):1043-9.
  133. Singh N, Alexander BD, Lortholary O, Dromer F, Gupta KL, John GT, et al. *Cryptococcus neoformans* in Organ Transplant Recipients: Impact of Calcineurin-Inhibitor Agents on Mortality. *J Infect Dis.* 2007;195(5):756-64.
  134. Husain S, Wagener MM, Singh N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3):375-81.



135. Wu G, Vilchez RA, Eidelman B, Fung J, Kormos R, Kusne S. Cryptococcal meningitis: an analysis among 5,521 consecutive organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2002;4(4):183-8.
136. Sugiura Y, Homma M, Yamamoto T. Difficulty in diagnosing chronic meningitis caused by capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76(10):1460-1.
137. Torres HA, Prieto VG, Raad, II, Kontoyiannis DP. Proven pulmonary cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus neoformans* does not differ clinically from proven pulmonary cryptococcosis due to capsule-intact *Cr. neoformans*. *Mycoses.* 2005;48(1):21-4.
138. Wu TC, Koo SY. Comparison of three commercial cryptococcal latex kits for detection of cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol.* 1983;18(5):1127-30.
139. Tanner DC, Weinstein MP, Fedorciw B, Joho KL, Thorpe JJ, Reller L. Comparison of commercial kits for detection of cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol.* 1994;32(7):1680-4.
140. Jarvis JN, Percival A, Bauman S, Pelfrey J, Meintjes G, Williams GN, et al. Evaluation of a novel point-of-care cryptococcal antigen test on serum, plasma, and urine from patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 2011;53(10):1019-23.
141. Nalintya E, Kiggundu R, Meya D. Evolution of Cryptococcal Antigen Testing: What is new? *Curr Fungal Infec Rep.* 2016;10(2):62-7.
142. Huang HR, Fan LC, Rajbanshi B, Xu JF. Evaluation of a new cryptococcal antigen lateral flow immunoassay in serum, cerebrospinal fluid and urine for the diagnosis of cryptococcosis: a meta-analysis and systematic review. *PloS One.* 2015;10(5):e0127117.
143. Tang MW, Clemons KV, Katzenstein DA, Stevens DA. The cryptococcal antigen lateral flow assay: A point-of-care diagnostic at an opportune time. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(4):634-42.
144. French N, Gray K, Watera C, Nakiyingi J, Lugada E, Moore M, et al. Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults. *Aids.* 2002;16(7):1031-8.
145. Tone K, Umeda Y, Makimura K. Cross-reactivity in *Cryptococcus* antigen latex agglutination test in two commercial kits. *Med Mycol.* 2016;54(4):439-43.

146. Zimbres ACG, Albuquerque PC, Joffe LS, Souza TN, Nimrichter L, Frazao SO, et al. A glucuronoxylomannan-like glycan produced by *Trichosporon mucoides*. Fungal Genet Biol. 2018;121:46-55.
147. Kabanda T, Siedner MJ, Klausner JD, Muzoora C, Boulware DR. Point-of-care diagnosis and prognostication of cryptococcal meningitis with the cryptococcal antigen lateral flow assay on cerebrospinal fluid. Clin Infect Dis. 2014;58(1):113-6.
148. Brouwer AE, Teparrukkul P, Pinpraphaporn S, Larsen RA, Chierakul W, Peacock S, et al. Baseline correlation and comparative kinetics of cerebrospinal fluid colony-forming unit counts and antigen titers in cryptococcal meningitis. J Infect Dis. 2005;192(4):681-4.
149. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. Clin Infect Dis. 2010;50(3):291-322.
150. Jarvis JN, Boule A, Loyse A, Bicanic T, Rebe K, Williams A, et al. High ongoing burden of cryptococcal disease in Africa despite antiretroviral roll out. Aids. 2009;23(9):1182-3.
151. Jarvis JN, Harrison TS, Lawn SD, Meintjes G, Wood R, Cleary S. Cost effectiveness of cryptococcal antigen screening as a strategy to prevent HIV-associated cryptococcal meningitis in South Africa. PloS One. 2013;8(7):e69288.
152. Jarvis JN, Govender N, Chiller T, Park BJ, Longley N, Meintjes G, et al. Cryptococcal antigen screening and preemptive therapy in patients initiating antiretroviral therapy in resource-limited settings: a proposed algorithm for clinical implementation. J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic). 2012;11(6):374-9.
153. Moretti ML, Resende MR, Lazera MS, Colombo AL, Shikanai-Yasuda MA. Guidelines in cryptococcosis--2008. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(5):524-44.
154. Deresinski SC, Stevens DA. Caspofungin. Clin Infect Dis. 2003;36(11):1445-57.
155. Loyse A, Wilson D, Meintjes G, Jarvis JN, Bicanic T, Bishop L, et al. Comparison of the early fungicidal activity of high-dose fluconazole, voriconazole, and flucytosine as second-line drugs given in combination with

- amphotericin B for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 2012;54(1):121-8.
156. Thompson GR, 3rd, Rendon A, Ribeiro Dos Santos R, Queiroz-Telles F, Ostrosky-Zeichner L, Azie N, et al. Isavuconazole Treatment of Cryptococcosis and Dimorphic Mycoses. *Clin Infect Dis.* 2016;63(3):356-62.
  157. Bicanic T, Muzoora C, Brouwer AE, Meintjes G, Longley N, Taseera K, et al. Independent association between rate of clearance of infection and clinical outcome of HIV-associated cryptococcal meningitis: analysis of a combined cohort of 262 patients. *Clin Infect Dis.* 2009;49(5):702-9.
  158. van der Horst CM, Saag MS, Cloud GA, Hamill RJ, Graybill JR, Sobel JD, et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med.* 1997;337(1):15-21.
  159. Day JN, Chau TT, Laloo DG. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N Engl J Med.* 2013;368(26):2522-3.
  160. Graybill JR, Sobel J, Saag M, van Der Horst C, Powderly W, Cloud G, et al. Diagnosis and management of increased intracranial pressure in patients with AIDS and cryptococcal meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and AIDS Cooperative Treatment Groups. *Clin Infect Dis.* 2000;30(1):47-54.
  161. Denning DW, Armstrong RW, Lewis BH, Stevens DA. Elevated cerebrospinal fluid pressures in patients with cryptococcal meningitis and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med.* 1991;91(3):267-72.
  162. Rolfes MA, Hullsiek KH, Rhein J, Nabeta HW, Taseera K, Schutz C, et al. The effect of therapeutic lumbar punctures on acute mortality from cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 2014;59(11):1607-14.
  163. Beardsley J, Wolbers M, Kibengo FM, Ggayi AB, Kamali A, Cuc NT, et al. Adjunctive Dexamethasone in HIV-Associated Cryptococcal Meningitis. *N Engl J Med.* 2016;374(6):542-54.
  164. Newton PN, Thai le H, Tip NQ, Short JM, Chierakul W, Rajanuwong A, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of acetazolamide for the treatment of elevated intracranial pressure in cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 2002;35(6):769-72.

165. Lortholary O, Fontanet A, Memain N, Martin A, Sitbon K, Dromer F. Incidence and risk factors of immune reconstitution inflammatory syndrome complicating HIV-associated cryptococcosis in France. *Aids*. 2005;19(10):1043-9.
166. Shelburne SA, 3rd, Darcourt J, White AC, Jr., Greenberg SB, Hamill RJ, Atmar RL, et al. The role of immune reconstitution inflammatory syndrome in AIDS-related *Cryptococcus neoformans* disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2005;40(7):1049-52.
167. Singh N, Perfect JR. Immune reconstitution syndrome associated with opportunistic mycoses. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(6):395-401.
168. Sun HY, Alexander BD, Huprikar S, Forrest GN, Bruno D, Lyon GM, et al. Predictors of immune reconstitution syndrome in organ transplant recipients with cryptococcosis: implications for the management of immunosuppression. *Clin Infect Dis*. 2015;60(1):36-44.
169. Bloom RD, Goldberg LR, Wang AY, Faust TW, Kotloff RM. An overview of solid organ transplantation. *Clin Chest Med*. 2005;26(4):529-43.
170. OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Introduction. *Am J Transplant*. 2018;18 Suppl 1:10-7.
171. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - ABTO. Registro Brasileiro de Transplantes [Internet]. São Paulo(SP): ABTO; 2017 Ano XXII, No.:4. [citede 2018 Nov 2]. p. 1-101. Available from: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2017/rbt-imprensa-leitura-compressed.pdf>.
172. Medina-Pestana J. Excellence and Efficiency Through a Structured Large Scale Approach: The Hospital Do Rim in Sao Paulo, Brazil. *Transplantation*. 2017;101(8):1735-8.
173. Opelz G, Dohler B. Association of HLA mismatch with death with a functioning graft after kidney transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant*. 2012;12(11):3031-8.
174. Parasuraman R, Abouljoud M, Jacobsen G, Reddy G, Koffron A, Venkat KK. Increasing trend in infection-related death-censored graft failure in renal transplantation. *Transplantation*. 2011;91(1):94-9.
175. Ferraz AS, Martins AC, Becker PF, Marques MM, Suaid HJ, Ciconelli AJ. Disseminated cryptococcosis (torulosis) following renal transplantation. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1976;18(2):120-7.

176. Nobrega JP, Livramento JA, Machado LR, Spina-Franca A. Cryptococcosis of the central nervous system: evaluation of amphotericin-B, 5-fluorocytosine and miconazole therapy in 18 cases. *Arq Neuropsiquiatr.* 1979;37(1):28-33.
177. Nobrega JP. Amphotericin B in the treatment of neurocryptococcosis in patients subjected to renal transplantation. *Arq Neuropsiquiatr.* 1988;46(2):117-26.
178. Moysés Neto M, Muglia V, Batista MEPN, Pisi TM, Saber LTS, Ferraz AS, et al. Infecção por fungos e transplante renal: análise nos primeiros 500 pacientes transplantados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. *J Bras Nefrol.* 1995;17(3):162-70.
179. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis.* 2010;50(8):1101-11.
180. Neofytos D, Fishman JA, Horn D, Anaissie E, Chang CH, Olyaei A, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2010;12(3):220-9.
181. Abbott KC, Hypolite I, Poropatich RK, Hshieh P, Cruess D, Hawkes CA, et al. Hospitalizations for fungal infections after renal transplantation in the United States. *Transpl Infect Dis.* 2001;3(4):203-11.
182. Guimaraes LF, Halpern M, de Lemos AS, de Gouvea EF, Goncalves RT, da Rosa Santos MA, et al. Invasive Fungal Disease in Renal Transplant Recipients at a Brazilian Center: Local Epidemiology Matters. *Transplant Proc.* 2016;48(7):2306-9.
183. Gallis HA, Berman RA, Cate TR, Hamilton JD, Gunnells JC, Stickel DL. Fungal infection following renal transplantation. *Arch Intern Med.* 1975;135(9):1163-72.
184. Vilchez R, Shapiro R, McCurry K, Kormos R, Abu-Elmagd K, Fung J, et al. Longitudinal study of cryptococcosis in adult solid-organ transplant recipients. *Transpl Int.* 2003;16(5):336-40.
185. George IA, Santos CAQ, Olsen MA, Powderly WG. Epidemiology of Cryptococcosis and Cryptococcal Meningitis in a Large Retrospective Cohort of Patients After Solid Organ Transplantation. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(1):ofx004.

186. Yang YL, Chen M, Gu JL, Zhu FY, Xu XG, Zhang C, et al. Cryptococcosis in kidney transplant recipients in a Chinese university hospital and a review of published cases. *Int J Infect Dis.* 2014;26:154-61.
187. Gassiep I, McDougall D, Douglas J, Francis R, Playford EG. Cryptococcal infections in solid organ transplant recipients over a 15-year period at a state transplant center. *Transpl Infect Dis.* 2017;19(1).
188. Marques S, Carmo R, Ferreira I, Bustorff M, Sampaio S, Pestana M. Cryptococcosis in Renal Transplant Recipients: A Single-Center Experience. *Transplant Proc.* 2016;48(7):2289-93.
189. John GT, Mathew M, Snehalatha E, Anandi V, Date A, Jacob CK, et al. Cryptococcosis in renal allograft recipients. *Transplantation.* 1994;58(7):855-6.
190. Shaariah W, Morad Z, Suleiman AB. Cryptococcosis in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 1992;24(5):1898-9.
191. Sampaio M, Ianhez LE, Sabbaga E. Protective effect of cyclosporine in human renal posttransplant cryptococcosis. *Transplant Proc.* 1992;24(6):3091.
192. Watson AJ, Russell RP, Cabreja RF, Braverman R, Whelton A. Cure of cryptococcal infection during continued immunosuppressive therapy. *Q J Med.* 1985;55(217):169-72.
193. Blankenship JR, Singh N, Alexander BD, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* isolates from transplant recipients are not selected for resistance to calcineurin inhibitors by current immunosuppressive regimens. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):464-7.
194. Singh N, Lortholary O, Alexander BD, Gupta KL, John GT, Pursell KJ, et al. Antifungal management practices and evolution of infection in organ transplant recipients with *Cryptococcus neoformans* infection. *Transplantation.* 2005;80(8):1033-9.
195. Pappas PG. Therapy of Cryptococcal Meningitis in non-HIV-infected Patients. *Curr Infect Dis Rep.* 2001;3(4):365-70.
196. Osawa R, Alexander BD, Lortholary O, Dromer F, Forrest GN, Lyon GM, et al. Identifying predictors of central nervous system disease in solid organ transplant recipients with cryptococcosis. *Transplantation.* 2010;89(1):69-74.
197. Chen SC, Slavin MA, Heath CH, Playford EG, Byth K, Marriott D, et al. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. *Clin Infect Dis.* 2012;55(6):789-98.

198. Cicora F, Petroni J, Formosa P, Roberti J. A rare case of *Cryptococcus gattii* pneumonia in a renal transplant patient. *Transpl Infect Dis.* 2015;17(3):463-6.
199. Forrest GN, Bhalla P, DeBess EE, Winthrop KL, Lockhart SR, Mohammadi J, et al. *Cryptococcus gattii* infection in solid organ transplant recipients: description of Oregon outbreak cases. *Transpl Infect Dis.* 2015;17(3):467-76.
200. Wirth F, Azevedo MI, Goldani LZ. Molecular types of *Cryptococcus* species isolated from patients with cryptococcal meningitis in a Brazilian tertiary care hospital. *Braz J Infect Dis.* 2018; pii: S1413-8670(18)31053-5.
201. Saha DC, Goldman DL, Shao X, Casadevall A, Husain S, Limaye AP, et al. Serologic evidence for reactivation of cryptococcosis in solid-organ transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(12):1550-4.
202. Vilchez RA, Fung J, Kusne S. Cryptococcosis in organ transplant recipients: an overview. *Am J Transplant.* 2002;2(7):575-80.
203. Sun HY, Alexander BD, Lortholary O, Dromer F, Forrest GN, Lyon GM, et al. Unrecognized pretransplant and donor-derived cryptococcal disease in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2010;51(9):1062-9.
204. Diamond RD, Bennett JE. Prognostic factors in cryptococcal meningitis. A study in 111 cases. *Ann Intern Med.* 1974;80(2):176-81.
205. Silveira FP, Husain S, Kwak EJ, Linden PK, Marcos A, Shapiro R, et al. Cryptococcosis in liver and kidney transplant recipients receiving anti-thymocyte globulin or alemtuzumab. *Transpl Infect Dis.* 2007;9(1):22-7.
206. Baddley JW, Forrest GN, Practice ASTIDCo. Cryptococcosis in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13 Suppl 4:242-9.
207. Fromtling RA, Fromtling AM, Staib F, Muller S. Effect of uremia on lymphocyte transformation and chemiluminescence by spleen cells of normal and *Cryptococcus neoformans*-infected mice. *Infection and immunity.* 1981;32(3):1073-8.
208. Wheat JL, Goldman M, Sarosi GA. Cryptococcosis. Rubin RH, Young LS, editors. New York: Kluwer Academi/Plenum; 2002. 228-31 p.
209. Kontoyiannis DP, Lewis RE, Alexander BD, Lortholary O, Dromer F, Gupta KL, et al. Calcineurin inhibitor agents interact synergistically with antifungal agents in vitro against *Cryptococcus neoformans* isolates: correlation with outcome in solid organ transplant recipients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):735-8.



210. Odom A, Del Poeta M, Perfect J, Heitman J. The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685,818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(1):156-61.
211. Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect J, Heitman J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Embo J.* 1997;16(10):2576-89.
212. Fishman JA. Infection in Organ Transplantation. *Am J Transplant.* 2017;17(4):856-79.
213. Fiorillo AM, Lima RH, Martinez R, Levy CE, Takayanagui OM, Barbieri Neto J. *Cryptococcus* meningitis: clinical course, development and histopathologic aspects depending on the predisposing factors. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1990;23(1):19-25.
214. Jabbour N, Reyes J, Kusne S, Martin M, Fung J. Cryptococcal meningitis after liver transplantation. *Transplantation.* 1996;61(1):146-9.
215. Vilchez RA, Irish W, Lacomis J, Costello P, Fung J, Kusne S. The clinical epidemiology of pulmonary cryptococcosis in non-AIDS patients at a tertiary care medical center. *Medicine (Baltimore).* 2001;80(5):308-12.
216. Sun HY, Wagener MM, Singh N. Cryptococcosis in solid-organ, hematopoietic stem cell, and tissue transplant recipients: evidence-based evolving trends. *Clin Infect Dis.* 2009;48(11):1566-76.
217. Schroter GP, Temple DR, Husberg BS, Weil R, 3rd, Starzl TE. Cryptococcosis after renal transplantation: report of ten cases. *Surgery.* 1976;79(3):268-77.
218. Singh N, Lortholary O, Dromer F, Alexander BD, Gupta KL, John GT, et al. Central nervous system cryptococcosis in solid organ transplant recipients: clinical relevance of abnormal neuroimaging findings. *Transplantation.* 2008;86(5):647-51.
219. Dismukes WE, Cloud G, Gallis HA, Kerkering TM, Medoff G, Craven PC, et al. Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. *N Engl J Med.* 1987;317(6):334-41.
220. Leenders AC, Daenen S, Jansen RL, Hop WC, Lowenberg B, Wijermans PW, et al. Liposomal amphotericin B compared with amphotericin B deoxycholate in

- the treatment of documented and suspected neutropenia-associated invasive fungal infections. *Br J Haematol.* 1998;103(1):205-12.
221. Sun HY, Alexander BD, Lortholary O, Dromer F, Forrest GN, Lyon GM, et al. Lipid formulations of amphotericin B significantly improve outcome in solid organ transplant recipients with central nervous system cryptococcosis. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1721-8.
  222. Singh N. How I treat cryptococcosis in organ transplant recipients. *Transplantation.* 2012;93(1):17-21.
  223. Girois SB, Chapuis F, Decullier E, Revol BG. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25(2):138-49.
  224. Falci DR, da Rosa FB, Pasqualotto AC. Comparison of nephrotoxicity associated to different lipid formulations of amphotericin B: a real-life study. *Mycoses.* 2015;58(2):104-12.
  225. Stamm AM, Diasio RB, Dismukes WE, Shadomy S, Cloud GA, Bowles CA, et al. Toxicity of amphotericin B plus flucytosine in 194 patients with cryptococcal meningitis. *Am J Med.* 1987;83(2):236-42.
  226. Wingard JR, Kubilis P, Lee L, Yee G, White M, Walshe L, et al. Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 1999;29(6):1402-7.
  227. Conti DJ, Tolkoff-Rubin NE, Baker GP, Jr., Doran M, Cosimi AB, Delmonico F, et al. Successful treatment of invasive fungal infection with fluconazole in organ transplant recipients. *Transplantation.* 1989;48(4):692-5.
  228. Legris T, Massad M, Purgus R, Vacher-Coponat H, Ranque S, Girard N, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome mimicking relapsing cryptococcal meningitis in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis.* 2011;13(3):303-8.
  229. Singh N, Lortholary O, Alexander BD, Gupta KL, John GT, Pursell K, et al. An immune reconstitution syndrome-like illness associated with *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2005;40(12):1756-61.
  230. Singh N, Lortholary O, Alexander BD, Gupta KL, John GT, Pursell K, et al. Allograft loss in renal transplant recipients with *Cryptococcus neoformans* associated immune reconstitution syndrome. *Transplantation.* 2005;80(8):1131-3.

231. de Castro Rodrigues Ferreira F, Cristelli MP, Paula MI, Proenca H, Felipe CR, Tedesco-Silva H, et al. Infectious complications as the leading cause of death after kidney transplantation: analysis of more than 10,000 transplants from a single center. *J Nephrol*. 2017;30(4):601-6.
232. O'Meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(3):387-408.
233. Li SS, Mody CH. *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc*. 2010;7(3):186-96.
234. Casadevall A, Coelho C, Cordero RJB, Dragotakes Q, Jung E, Vij R, et al. The Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence*. 2018:1-10.
235. Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S, et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature*. 2005;437(7063):1360-4.
236. Kozubowski L, Heitman J. Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(1):78-94.
237. Nielsen K, Cox GM, Litvintseva AP, Mylonakis E, Malliaris SD, Benjamin DK, Jr., et al. *Cryptococcus neoformans* {alpha} strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. *Infect Immun*. 2005;73(8):4922-33.
238. D'Souza CA, Kronstad JW, Taylor G, Warren R, Yuen M, Hu G, et al. Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *mBio*. 2011;2(1):e00342-10.
239. Ngamskulrungron P, Price J, Sorrell T, Perfect JR, Meyer W. *Cryptococcus gattii* virulence composite: candidate genes revealed by microarray analysis of high and less virulent vancouver island outbreak strains. *PloS One*. 2011;6(1):e16076.
240. Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung J, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus* from Human Pathogen to Model Yeast. 1st ed. Washington (DC): American Society for Microbiology Press; 2011. 620 p.
241. Springer DJ, Phadke S, Billmyre B, Heitman J. *Cryptococcus gattii*, no longer an accidental pathogen? *Curr Fungal Infect Rep*. 2012;6(4):245-56.
242. Galanis E, Macdougall L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(2):251-7.
243. Mitchell DH, Sorrell TC, Allworth AM, Heath CH, McGregor AR, Papanicolaou K, et al. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of

- cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. Clin Infect Dis. 1995;20(3):611-6.
244. Chen M, Pan WH, Boekhout T. *Cryptococcus gattii* infections in China: extent of the problem? Chin Med J (Engl). 2013;126(2):203-5.
  245. Franco-Paredes C, Womack T, Bohlmeier T, Sellers B, Hays A, Patel K, et al. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. Lancet Infect Dis. 2015;15(3):348-55.
  246. Cheng PY, Sham A, Kronstad JW. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. Infection and immunity. 2009;77(10):4284-94.
  247. Chen Y, Farrer RA, Giamberardino C, Sakthikumar S, Jones A, Yang T, et al. Microevolution of Serial Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *C. gattii*. mBio. 2017;8(2) pii: e00166-17.
  248. Ngamskulrungron P, Serena C, Gilgado F, Malik R, Meyer W. Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype. Clin Microbiol Infect. 2011;17(2):251-8.
  249. Byrnes EJ, 3rd, Li W, Ren P, Lewit Y, Voelz K, Fraser JA, et al. A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in southern Californian HIV/AIDS patients. PLoS Pathog. 2011;7(9):e1002205.
  250. Thompson GR, 3rd, Albert N, Hodge G, Wilson MD, Sykes JE, Bays DJ, et al. Phenotypic differences of *Cryptococcus* molecular types and their implications for virulence in a *Drosophila* model of infection. Infect Immun. 2014;82(7):3058-65.
  251. Firacative C, Duan S, Meyer W. *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. PloS One. 2014;9(8):e105076.
  252. Farrer RA, Desjardins CA, Sakthikumar S, Gujja S, Saif S, Zeng Q, et al. Genome Evolution and Innovation across the Four Major Lineages of *Cryptococcus gattii*. mBio. 2015;6(5):e00868-15.
  253. Billmyre RB, Croll D, Li W, Mieczkowski P, Carter DA, Cuomo CA, et al. Highly recombinant VGII *Cryptococcus gattii* population develops clonal outbreak clusters through both sexual macroevolution and asexual microevolution. mBio. 2014;5(4):e01494-14.

254. Fernandes KE, Dwyer C, Campbell LT, Carter DA. Species in the *Cryptococcus gattii* Complex Differ in Capsule and Cell Size following Growth under Capsule-Inducing Conditions. *mSphere*. 2016;1(6) pii: e00350-16.
255. Velez N, Alvarado M, Parra-Giraldo CM, Sanchez-Quitian ZA, Escandon P, Castaneda E. Genotypic Diversity Is Independent of Pathogenicity in Colombian Strains of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in *Galleria mellonella*. *Journal of fungi*. 2018;4(3) pii: E82.
256. Aminnejad M, Cogliati M, Duan S, Arabatzis M, Tintelnot K, Castaneda E, et al. Identification and Characterization of VNI/VNII and Novel VNII/VNIV Hybrids and Impact of Hybridization on Virulence and Antifungal Susceptibility Within the *C. neoformans*/*C. gattii* Species Complex. *PLoS One*. 2016;11(10):e0163955.
257. Rodrigues J, Fonseca FL, Schneider RO, Godinho RM, Firacative C, Maszewska K, et al. Pathogenic diversity amongst serotype C VGIII and VGIV *Cryptococcus gattii* isolates. *Sci Rep*. 2015;5:11717.
258. Torres-Rodriguez JM, Morera Y, Baro T, Corominas JM, Castaneda E. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an immunocompetent mouse model. *Med Mycol*. 2003;41(1):59-63.
259. Fernandes KE, Brockway A, Haverkamp M, Cuomo CA, van Ogtrop F, Perfect JR, et al. Phenotypic Variability Correlates with Clinical Outcome in *Cryptococcus* Isolates Obtained from Botswanan HIV/AIDS Patients. *mBio*. 2018;9(5) pii: e02016-18.
260. Beale MA, Sabiiti W, Robertson EJ, Fuentes-Cabrejo KM, O'Hanlon SJ, Jarvis JN, et al. Genotypic Diversity Is Associated with Clinical Outcome and Phenotype in Cryptococcal Meningitis across Southern Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6):e0003847.
261. Wiesner DL, Moskalenko O, Corcoran JM, McDonald T, Rolfes MA, Meya DB, et al. Cryptococcal genotype influences immunologic response and human clinical outcome after meningitis. *mBio*. 2012;3(5) pii: e00196-12.
262. Day JN, Qihui S, Thanh LT, Trieu PH, Van AD, Thu NH, et al. Comparative genomics of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* associated with meningitis in HIV infected and uninfected patients in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):e0005628.

263. Perfect JR. The triple threat of cryptococcosis: it's the body site, the strain, and/or the host. *mBio*. 2012;3(4) pii: e00165-12.
264. Desnos-Ollivier M, Patel S, Raoux-Barbot D, Heitman J, Dromer F, French Cryptococcosis Study G. Cryptococcosis Serotypes Impact Outcome and Provide Evidence of *Cryptococcus neoformans* Speciation. *mBio*. 2015;6(3):e00311.
265. Mandal P, Banerjee U, Casadevall A, Nosanchuk JD. Dual infections with pigmented and albino strains of *Cryptococcus neoformans* in patients with or without human immunodeficiency virus infection in India. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4766-72.
266. Haynes KA, Sullivan DJ, Coleman DC, Clarke JC, Emilianus R, Atkinson C, et al. Involvement of multiple *Cryptococcus neoformans* strains in a single episode of cryptococcosis and reinfection with novel strains in recurrent infection demonstrated by random amplification of polymorphic DNA and DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol*. 1995;33(1):99-102.
267. Arsic Arsenijevic V, Pekmezovic MG, Meis JF, Hagen F. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of Serbian *Cryptococcus neoformans* isolates. *Mycoses*. 2014;57(6):380-7.
268. Bertout S, Drakulovski P, Kouanfack C, Krasteva D, Ngouana T, Dunyach-Remy C, et al. Genotyping and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* isolates from Cameroonian HIV-positive adult patients. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(8):763-9.
269. Igreja RP, Lazera Mdos S, Wanke B, Galhardo MC, Kidd SE, Meyer W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Med Mycol*. 2004;42(3):229-38.
270. Van Wyk M, Govender NP, Mitchell TG, Litvintseva AP, Germs SA. Multilocus sequence typing of serially collected isolates of *Cryptococcus* from HIV-infected patients in South Africa. *J Clin Microbiol*. 2014;52(6):1921-31.
271. Lin X, Patel S, Litvintseva AP, Floyd A, Mitchell TG, Heitman J. Diploids in the *Cryptococcus neoformans* serotype A population homozygous for the alpha mating type originate via unisexual mating. *PLoS Pathog*. 2009;5(1):e1000283.
272. Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Fonseca FM, Ferreira TB, Mora DJ, Andrade-Silva J, et al. MLST-Based Population Genetic Analysis in a Global Context Reveals Clonality amongst *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI

- Isolates from HIV Patients in Southeastern Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(1):e0005223.
273. Miglia KJ, Govender NP, Rossouw J, Meiring S, Mitchell TG, Group for Enteric R, et al. Analyses of pediatric isolates of *Cryptococcus neoformans* from South Africa. J Clin Microbiol. 2011;49(1):307-14.
  274. Chuck SL, Sande MA. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med. 1989;321(12):794-9.
  275. Larsen RA, Leal MA, Chan LS. Fluconazole compared with amphotericin B plus flucytosine for cryptococcal meningitis in AIDS. A randomized trial. Ann Intern Med. 1990;113(3):183-7.
  276. Saag MS, Powderly WG, Cloud GA, Robinson P, Grieco MH, Sharkey PK, et al. Comparison of amphotericin B with fluconazole in the treatment of acute AIDS-associated cryptococcal meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and the AIDS Clinical Trials Group. N Engl J Med. 1992;326(2):83-9.
  277. Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Brugiere O, Letenneur L. Comparison of the efficacy of amphotericin B and fluconazole in the treatment of cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients: retrospective analysis of 83 cases. French Cryptococcosis Study Group. Clin Infect Dis. 1996;22 Suppl 2:S154-60.
  278. Crabtree Ramirez B, Caro Vega Y, Shepherd BE, Le C, Turner M, Frola C, et al. Outcomes of HIV-positive patients with cryptococcal meningitis in the Americas. Int J Infect Dis. 2017;63:57-63.
  279. Lee A, Toffaletti DL, Tenor J, Soderblom EJ, Thompson JW, Moseley MA, et al. Survival defects of *Cryptococcus neoformans* mutants exposed to human cerebrospinal fluid result in attenuated virulence in an experimental model of meningitis. Infect Immun. 2010;78(10):4213-25.
  280. Price MS, Betancourt-Quiroz M, Price JL, Toffaletti DL, Vora H, Hu G, et al. *Cryptococcus neoformans* requires a functional glycolytic pathway for disease but not persistence in the host. mBio. 2011;2(3):e00103-11.
  281. Darras-Joly C, Chevret S, Wolff M, Matheron S, Longuet P, Casalino E, et al. *Cryptococcus neoformans* infection in France: epidemiologic features of and early prognostic parameters for 76 patients who were infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 1996;23(2):369-76.



282. Jarvis JN, Bicanic T, Loyse A, Namarika D, Jackson A, Nussbaum JC, et al. Determinants of mortality in a combined cohort of 501 patients with HIV-associated Cryptococcal meningitis: implications for improving outcomes. *Clin Infect Dis*. 2014;58(5):736-45.
283. Bicanic T, Brouwer AE, Meintjes G, Rebe K, Limmathurotsakul D, Chierakul W, et al. Relationship of cerebrospinal fluid pressure, fungal burden and outcome in patients with cryptococcal meningitis undergoing serial lumbar punctures. *Aids*. 2009;23(6):701-6.
284. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third edition. CLSI document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2). Wayne, PA 19087, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
285. Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castanon-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5898-906.
286. Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Hagen F, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(6):3107-13.
287. Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazera M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *Med Mycol*. 2012;50(3):328-32.
288. Herkert PF, Hagen F, de Oliveira Salvador GL, Gomes RR, Ferreira MS, Vicente VA, et al. Molecular characterisation and antifungal susceptibility of clinical *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII) isolates from Southern Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(11):1803-10.
289. Gonzalez GM, Casillas-Vega N, Garza-Gonzalez E, Hernandez-Bello R, Rivera G, Rodriguez JA, et al. Molecular typing of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex from Northeast Mexico. *Folia Microbiol (Praha)*. 2016;61(1):51-6.

290. Herkert PF, Meis JF, Lucca de Oliveira Salvador G, Rodrigues Gomes R, Aparecida Vicente V, Dominguez Muro M, et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans sensu stricto* from southern Brazil. *Journal of medical microbiology*. 2018;67(4):560-9.
291. Lockhart SR, Iqbal N, Bolden CB, DeBess EE, Marsden-Haug N, Worhle R, et al. Epidemiologic cutoff values for triazole drugs in *Cryptococcus gattii*: correlation of molecular type and in vitro susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(2):144-8.
292. Nyazika TK, Herkert PF, Hagen F, Mateveke K, Robertson VJ, Meis JF. In vitro antifungal susceptibility profiles of *Cryptococcus* species isolated from HIV-associated cryptococcal meningitis patients in Zimbabwe. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;86(3):289-92.
293. Calvo BM, Colombo AL, Fischman O, Santiago A, Thompson L, Lazera M, et al. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *J Clin Microbiol*. 2001;39(6):2348-50.
294. Chowdhary A, Randhawa HS, Sundar G, Kathuria S, Prakash A, Khan Z, et al. In vitro antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. *J Med Microbiol*. 2011;60(Pt 7):961-7.
295. Hagen F, Hare Jensen R, Meis JF, Arendrup MC. Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility testing of 108 clinical *Cryptococcus neoformans sensu lato* and *Cryptococcus gattii sensu lato* isolates from Denmark. *Mycoses*. 2016;59(9):576-84.
296. Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Mora DJ, Da Silva PR, Andrade AA, Araujo NE, et al. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol*. 2013;51(6):635-40.
297. Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazera M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *Med Mycol*. 2011;50(3):328-32.

298. Chong HS, Dagg R, Malik R, Chen S, Carter D. In vitro susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. J Clin Microbiol. 2010;48(11):4115-20.
299. Iqbal N, DeBess EE, Wohrle R, Sun B, Nett RJ, Ahlquist AM, et al. Correlation of genotype and in vitro susceptibilities of *Cryptococcus gattii* strains from the Pacific Northwest of the United States. J Clin Microbiol. 2010;48(2):539-44.
300. Aller AI, Martin-Mazuelos E, Lozano F, Gomez-Mateos J, Steele-Moore L, Holloway WJ, et al. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(6):1544-8.
301. Davey KG, Johnson EM, Holmes AD, Szekeley A, Warnock DW. In-vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to fluconazole and itraconazole. J Antimicrob Chemother. 1998;42(2):217-20.
302. Bicanic T, Harrison T, Niepieklo A, Dyakopu N, Meintjes G. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. Clin Infect Dis. 2006;43(8):1069-73.
303. Cheong JW, McCormack J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? Med Mycol. 2013;51(3):261-9.
304. Smith KD, Achan B, Hullsiek KH, McDonald TR, Okagaki LH, Alhadab AA, et al. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(12):7197-204.
305. Rossi SA, Trevijano-Contador N, Scorzoni L, Mesa-Arango AC, de Oliveira HC, Werther K, et al. Impact of Resistance to Fluconazole on Virulence and Morphological Aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Isolates. Front Microbiol. 2016;7:153.
306. Morgan J, McCarthy KM, Gould S, Fan K, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, et al. *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002-2004. Clin Infect Dis. 2006;43(8):1077-80.
307. Agudelo CA, Munoz C, Ramirez A, Tobon AM, de Bedout Bact C, Cano LE, et al. Response to therapy in patients with cryptococcosis and AIDS: Association with in vitro susceptibility to fluconazole. Rev Iberoam Micol. 2015;32(4):214-20.
308. Casadevall A, Spitzer ED, Webb D, Rinaldi MG. Susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal

- meningitis to amphotericin B and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(6):1383-6.
309. Dannaoui E, Abdul M, Arpin M, Michel-Nguyen A, Piens MA, Favel A, et al. Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(7):2464-70.
  310. Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(7):2804-15.
  311. Tarai B, Kher V, Kotru P, Sabhikhi A, Barman P, Rattan A. Early onset primary pulmonary cryptococcosis in a renal transplant patient. *Indian J Med Microbiol.* 2010;28(3):250-2.
  312. Trpkovic A, Pekmezovic M, Barac A, Crncevic Radovic L, Arsic Arsenijevic V. In vitro antifungal activities of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole and itraconazole against *Cryptococcus neoformans* isolated from cerebrospinal fluid and blood from patients in Serbia. *J Mycol Med.* 2012;22(3):243-8.
  313. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;46(12):1813-21.
  314. Chen SC. Cryptococcosis in Australasia and the treatment of cryptococcal and other fungal infections with liposomal amphotericin B. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49 Suppl 1:57-61.
  315. Fichot EB, Norman RS. Microbial phylogenetic profiling with the Pacific Biosciences sequencing platform. *Microbiome.* 2013;1(1):10.
  316. Chen Y, Frazzitta AE, Litvintseva AP, Fang C, Mitchell TG, Springer DJ, et al. Next generation multilocus sequence typing (NGMLST) and the analytical software program MLSTEZ enable efficient, cost-effective, high-throughput, multilocus sequencing typing. *Fungal Genet Biol.* 2015;75:64-71.